

**Funktionelle Charakterisierung des
Cytoskelettproteins Profilin
als Tumorsuppressor**

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Nina Wittenmayer
aus Walsrode

1. Referentin: Prof. Dr. Brigitte M. Jockusch

2. Referent: Prof. Dr. Siegfried Scherneck

eingereicht am: 21.07.2003

mündliche Prüfung (Disputation) am: 02.10.2003

2003

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch Prof. Dr. Brigitte M. Jockusch, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen:

Wittenmayer, N., Rothkegel, M., Jockusch B.M. & Schluter, K. Functional characterization of green fluorescent protein-profilin fusion proteins. Eur. J. Biochem. **267**, 5247-5256 (2000)

Tagungsbeiträge:

Wittenmayer, N., Schlüter, K., Rothkegel M., Jockusch, B.M. Functional characterisation of GFP-fusion proteins with profilin. 24th Annual Meeting of the German Society for Cell Biology, Karlsruhe, March 16th – 30th, 2000

Wittenmayer, N., Schlüter, K., Rothkegel M., Jockusch, B.M. Functional characterisation of GFP-fusion proteins with profilin. 15th European Cytoskeleton Forum, Blankenberge, Belgium, August, 26th – 30th, 2000

Wittenmayer, N., Rothkegel, M., Jockusch, B.M. Functional Characterisation of Profilin as a Tumor Suppressor. 17th European Cytoskeleton Forum, Nyon-Geneva, Switzerland, August, 31th – 04th September, 2002

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen.....	IV
Zusammenfassung.....	VI
I. Einleitung	1
1. Das Cytoskelett eukaryonter Zellen	1
2. Profilin.....	3
2.1 Die Wechselwirkung mit Aktin.....	5
2.2 Die Wechselwirkung mit Poly-Prolin	9
2.3 Die Wechselwirkung mit PIP ₂	10
2.4 Die zelluläre Funktion von Profilin.....	12
3. Profilin als Tumorsuppressor-Protein	16
4. Zielsetzung	19
II. Material und Methoden	20
1. Material.....	20
1.1 Geräte	20
1.2 Chemikalien und Enzyme	20
1.3 Medien und Lösungen	20
1.4 Bakterienstämme	21
1.5 Vektoren.....	22
1.6 Oligodesoxynukleotide.....	22
1.7 Antikörper	22
1.8 Zelllinien	24
2. Methoden.....	24
2.1 Mikrobiologische Methoden	24
2.1.1 Anzucht von Bakterien.....	24
2.1.2 Dauerkultivierung von Bakterien	24
2.2 Molekularbiologische Methoden.....	25
2.2.1 Herstellung kompetenter Bakterien für die Transformation	25
2.2.2 Transformation kompetenter Bakterien	25

2.2.3	Minipräparation von Plasmid-DNA aus Bakterien	26
2.2.4	„Midi“ Plasmid-Präparation	26
2.2.5	Präparation genomischer DNA aus eukaryontischen Zellen.....	26
2.2.6	DNA-Konzentrationsbestimmung.....	27
2.2.7	Analytischer und präparativer Restriktionsverdau von DNA	27
2.2.8	Ligation	28
2.2.9	Agarosegelelektrophorese	28
2.2.10	DNA-Fragmentisolierung.....	29
2.2.11	DNA-Sequenzierung	29
2.3	Biochemische Methoden	30
2.3.1	Expression und Reinigung von rekombinantem Profilin	30
2.3.2	Proteinbestimmung nach Bradford (1976).....	33
2.3.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	33
2.3.4	Spezifischer Nachweis von Proteinen im Immunblot.....	35
2.4	Zellbiologische Methoden.....	36
2.4.1	Medien, Kulturgefäße und Kulturbedingungen	36
2.4.2	Passagieren von Zellen.....	36
2.4.3	Kryokonservierung von Zellen.....	36
2.4.4	Auftauen von kryokonservierten Zellen.....	37
2.4.5	Transfektion von Zellen	37
2.4.6	Herstellung von Zellextrakten.....	38
2.4.7	Herstellung von Proteinextrakten aus Gewebe	39
2.4.8	Direkte und Indirekte Immunfluoreszenz	39
2.4.9	„ Spreading“ von Zellen.....	40
2.4.10	Wachstumskurven von Zellen.....	41
2.4.11	Wachstum von Zellen in Weichagar	41
2.4.12	Wachstum im Matrigel.....	42
2.4.13	Injektion in Nacktmäuse.....	42
III.	Ergebnisse	<u>43</u>
1.	Herstellung stabil transfizierter CAL51 Zellklone	<u>43</u>
2.	Bestimmung der Profilinexpression in den stabilen Zellklonen	<u>45</u>
3.	Charakterisierung des tumorigenen Phänotyps der stabilen CAL51 Zellklone	<u>48</u>
3.1	Morphologie der CAL51 Zellklone.....	<u>49</u>

<u>3.2</u>	Organisation des Mikrofilamentsystems	<u>50</u>
3.3	Wachstum der CAL51 Zellklone	<u>53</u>
3.4	Analyse der Verankerungsunabhängigkeit.....	<u>55</u>
3.5	Analyse des Matrixkontaktes	<u>57</u>
3.6	Differenzierung im Matrigel	<u>59</u>
3.7	Tumorigenizität in Nacktmäusen	<u>61</u>
3.8	Nachweis der Profilinexpression in den Tumoren	<u>66</u>
 IV. Diskussion		69
1.	Ausblick.....	<u>72</u>
 V. Literaturverzeichnis		80
Danksagung		
Lebenslauf		

Abkürzungen

Å	Angström
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-Diphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
Arp	„actin related protein“
ATP	Adenosin-Triphosphat
bp	engl. Basenpaare
BSA	engl. Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C-Terminus	Carboxy-Terminus
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	copy-Desoxyribonukleinsäure
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerol
DMEM	„Dulbecco's Modified Eagle Medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTE	Dithioerythritol
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	„enzyme linked immunosorbent assay“
F-Aktin	filamentöses Aktin
FCS	engl. Fötale Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
g, mg, µg	Gramm, Milligramm, Mikrogramm
G-Aktin	globuläres Aktin
GFP	„green fluorescent protein“
h	engl. Stunde
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[Ethanschwefelsäure]
HMW	„high molecular weight marker“
HRP	engl. Meerrettich-Peroxidase
IF	Immunfluoreszenz
IP ₃	Inositol-1,4,5-Trisphosphat
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
kb	Kilobase
K _D	Dissoziationskonstante
kD	Kilodalton
L, ml, µl	Liter, Milliliter, Mikroliter
LB	Luria Broth
LMW	„low molecular weight marker“
m, cm, mm, µm, nm	Meter, Centimeter, Millimeter, Mikrometer, Nanometer
M, mM, µM, nM	molar, millimolar, mikromolar, nanomolar
mA	Milliampere
min	engl. Minute
mol, mmol, µmol	Mol, Millimol, Mikromol
mRNA	„messenger“-Ribonukleinsäure

MW	engl. Molekulargewicht
MWCO	engl. Molekulares Ausschussvolumen
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	optische Dichte
PCR	engl. Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-Diphosphat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	„rounds per minute“
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	engl. Natrium-Dodecylsulfat
SMN	„survival of motor neuron“
sog.	sogenannt
Tab.	Tabelle
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween-Zusatz
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
TRITC	Tetramethyl-Rhodaminisothiocyanat
U	engl. Enzymeinheit
ü.N.	über Nacht
V	Volt
Vgl.	Vergleich
v/v	Volumen pro Volumen
VASP	„vasodilator stimulated phosphoprotein“
w/v	Gewicht pro Volumen
WASP	„Wiskott-Aldrich syndrome protein“
WIP	„WASP interacting protein“
z.B.	zum Beispiel

Zusammenfassung

Profilin ist ein 12 bis 15 kDa großes Protein, das in allen Eukaryonten exprimiert wird. Es greift auf vielfältige Weise in verschiedene zelluläre Prozesse ein, seine genaue Funktion ist bisher jedoch nicht völlig verstanden. Für mehrzellige Organismen stellt Profilin ein essentielles Protein dar, da der „Knock Out“ von Profilin I letal ist. Es gibt mehrere Profilin Isoformen, die durch drei charakteristische Eigenschaften gekennzeichnet sind: Sie binden an globuläres Aktin, interagieren mit Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) und wechselwirken mit Poly-L-Prolin bzw. mit Proteinen, die Poly-Prolin-Motive enthalten. Profileine zeigen aufgrund ihrer Interaktion mit Aktin eine polymerisationsfördernde Funktion und wirken damit regulierend auf die Aktindynamik von Zellen. Durch die Interaktion mit PIP₂ und Poly-Prolin-Liganden, wie VASP oder p140mDia, sind Profileine auch direkt in Signaltransduktionswege, die zur Reorganisation des Mikrofilamentsystems führen, eingebunden. Ferner wirkt Profilin I als Tumorsuppressor in Brustkrebszellen, was in dieser Arbeit detaillierter untersucht werden sollte. Brustkrebszellen sind durch einen reduzierten Profilingehalt gekennzeichnet und die Restauration des Profilinspiegels mit Profilin I in der Zelllinie CAL51 führt zur Suppression der Tumorigenizität.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der zelluläre Profilingehalt in der Brustkrebszelllinie CAL51 mit Profilinmutanten, die jeweils in der Interaktion mit Aktin, PIP₂ oder Poly-Prolin-Liganden gestört sind, erhöht werden und Unterschiede in der Tumorsuppression analysiert werden. Hierfür wurden CAL51 Zellen mit Profilinmutanten stabil transfiziert und der tumorogene Phänotyp der stabil exprimierenden Zellklone charakterisiert.

Es wurden pro Profilinmutante mehrere CAL51 Zellklone generiert, die eine moderate Expressionsrate der Mutanten zeigen. Die stabile Expression der Mutanten führte nicht zu Veränderungen in der Morphologie der Zellen oder des Organisationsgrades vom Aktin-Cytoskelett. Die Proliferationsrate der Zellklone reduzierte sich durch die Expression aller Mutanten, ähnlich wie bei Wildtyp Profilin I-exprimierenden Kontrollzellen. Die Untersuchung des „Spreading“-Verhaltens zeigte, dass die Expression der Aktin-Bindungsmutante von Profilin nicht zu einer Verbesserung in der Formierung von Zell-Matrix-Kontakten führte, während die Expression der anderen beiden Mutanten ein verbessertes „Spreading“-Verhalten bewirkte. Ferner wuchsen CAL51 Zellen, die die Aktin-Bindungsmutante von Profilin exprimieren, verankerungsunabhängig, zeigten kein Differenzierungsvermögen in Matrigel und generierten nach Injektion in Nacktmäuse große Tumoren. Die Erhöhung des zellulären Profilingehalts durch die stabile Expression von Profilinmutanten, die reduzierte Affinitäten für PIP₂- und Poly-Prolin-Liganden besaßen, bewirkte in CAL51 Zellen eine Suppression der Tumorigenizität. Somit scheint eine intakte Aktinbindungsregion am Profilinmolekül für die Tumorsuppressoraktivität von Profilin notwendig zu sein. Über diese Bindungsregion interagiert Profilin mit den Liganden Aktin, Arp2 des Arp2/3-Komplexes und Gephyrin. Vermutlich ist der Bindung von Profilin an Gephyrin hierbei eine untergeordnete Bedeutung zu zuschreiben, während der Verlust der Affinität von Profilin für Aktin oder Arp2 massive Auswirkungen auf das Mikrofilamentsystem von eukaryontischen Zellen hat. Da die Mikrofilamentorganisation für einen normalen, differenzierten Phänotyp von Epithelzellen entscheidend wichtig ist, könnte man damit die Bedeutung der Profilin-Aktin- und Profilin-Arp2-Bindung für die Tumorsuppressoreigenschaft von Profilin erklären.

I. Einleitung

1. Das Cytoskelett eukaryonter Zellen

Eukaryontische Zellen müssen in der Lage sein, verschiedene Formen anzunehmen und koordinierte Bewegungen auszuführen, unabhängig davon ob sie im Gewebeverband organisiert sind oder als Einzelzelle wandern. Außerdem müssen intrazelluläre Transportvorgänge, wie der Transport von Organellen durch das Cytoplasma, Cytokinese und Motilität für das Bestehen der Zelle gewährleistet sein. Diese Fähigkeiten werden durch das Cytoskelett der Zelle ermöglicht, das hochdynamisch ist und gezielt umorganisiert werden kann. Die Zelle bedient sich verschiedener Filamentsysteme, um die oben aufgeführten Bewegungs- und Transportvorgänge zu gewährleisten. Es handelt sich dabei um Mikrotubuli, das Intermediärfilamentsystem und das Mikrofilamentsystem.

Das Mikrofilamentsystem besteht aus dem Protein Aktin, das zu doppeltsträngigen, helikalen Filamenten polymerisiert. Mikrofilamente bilden stabile Strukturen, wie den kontraktilen Apparat in Muskelzellen, den Kern der Mikrovilli oder Stressfasern in kultivierten Zellen, aus. Darüber hinaus ist das Mikrofilamentsystem für die Ausbildung von labilen Strukturen, die einer starken Dynamik unterworfen sind, verantwortlich. Im Zellkortex befindet sich ein dreidimensionales Netzwerk von Aktinfilamenten, das aufgrund seines starken Reorganisationsvermögens der Zelle gerichtete Fortbewegung ermöglicht und für die Formgebung der Zelle verantwortlich ist. In Bewegungsrichtung kann die Zelle flache Membranausläufer, die Lamellipodien, durch ständig polymerisierende Aktinfilamente ausbilden. Aus den Lamellipodien ragen oft „microspikes“ oder Filopodien heraus, die lockere Bündel von parallel angeordneten Aktinfilamenten beinhalten (Small et al., 1996). Abbildung 1 zeigt die durch das Aktin-Cytoskelett ausgebildeten typischen Strukturen einer Zelle. Lamellipodien und Filopodien können durch „focal adhesions“ am Substrat fixiert werden, während nicht fixierte Lamellipodien sich zurückbilden, indem sie als „ruffles“ über die Zelloberfläche zurücklaufen (Alberts et al., 1994). Diese komplexen Bewegungsvorgänge werden durch das Zusammenspiel von Mikrofilamenten und assoziierten Proteinen ermöglicht und durch äußere Signale, wie Wachstumsfaktoren, die an Zelloberflächenrezeptoren binden, gesteuert. Die Signale werden von der Zelloberfläche u.a. über kleine GTPasen an das Aktin-

Cytoskelett weitergegeben. Beispielsweise vermittelt die GTPase Rho Signale, die Einfluss auf die Bildung von Fokalkontakten und Stressfasern haben (Ridley and Hall, 1992).

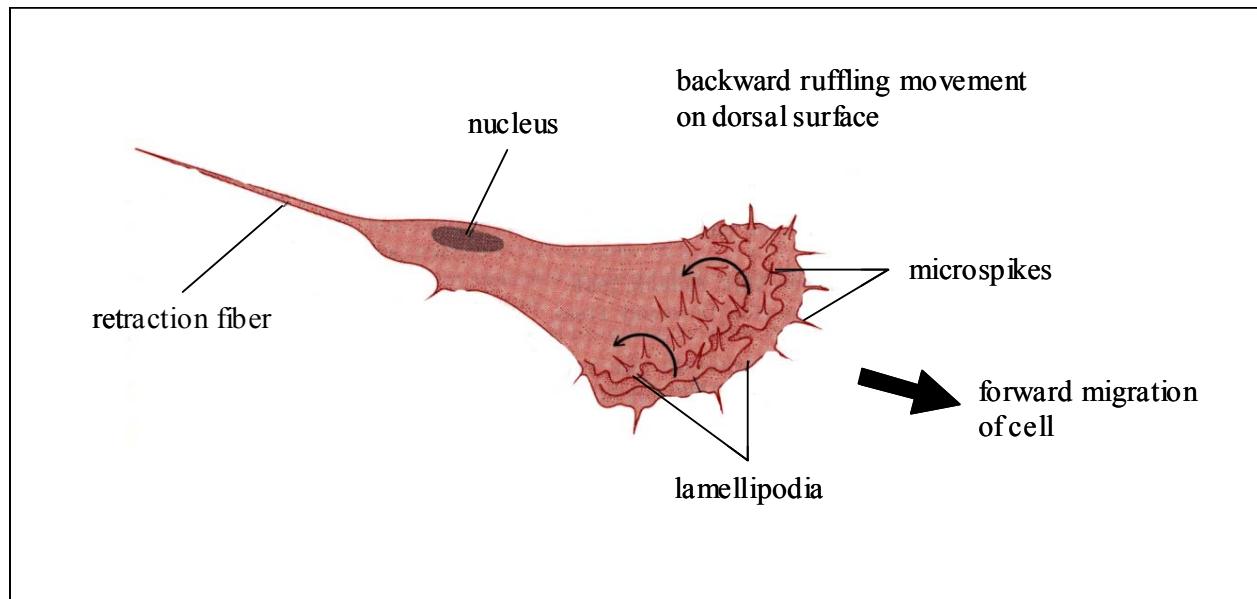


Abb.1: Darstellung typischer Strukturen einer wandernden Zelle.

Es sind die typischen Strukturen, wie „microspikes“, das Lamellipodium und das „ruffling“ einer wandernden Zelle (Bewegungsrichtung in Pfeilrichtung) gezeigt. Mit Hilfe des Mikrofilamentsystems kann die Zelle derartige Strukturen ausbilden und sich fortbewegen (aus Alberts et al., 1995).

Die Dynamik und die Flexibilität des Mikrofilamentsystems entsteht zum einen durch das Polymerisationsvermögen der Aktinmonomere und zum anderen durch die regulatorischen Einflüsse einer Vielzahl von Aktin-bindenden Proteinen.

Die dreidimensionale Struktur von Aktinfilamenten in Zellen wird durch vernetzende und bündelnde Aktin-bindende Proteine, wie α -Actinin, Filamin oder Fimbrin, vermittelt (Blanchard et al., 1989; Bretscher and Weber, 1980; Gorlin et al., 1990). Fragmentierungsproteine, wie Gelsolin, Villin oder Severin, schneiden bereits bestehende Aktinfilamente und generieren auf diese Weise freie Enden, die Ausgangspositionen für neue Aktinpolymerisationen sind (Craig and Powell, 1980; Yamamoto et al., 1982; Yin and Stossel, 1979). „Capping“-Proteine besetzen freie Enden der Aktinfilamente und schützen diese vor Depolymerisation oder Polymerisation, wodurch das Wachstum eines Filaments exakt reguliert werden kann (Carlier and Pantaloni, 1997; Schafer and Cooper, 1995). Eine Voraussetzung für viele dieser flexiblen Prozesse ist die Aufrechterhaltung eines Depots an Aktinmonomeren, die jederzeit für die Aktinpolymerisation zur Verfügung stehen müssen. Die Konzentration an G-Aktin ist in Zellen höher als die kritische Konzentration der

Aktinpolymerisation, so dass G-Aktin-bindende Proteine einen Pool an nicht-polymerisiertem G-Aktin stabilisieren und damit zur Flexibilität des Mikrofilamentsystems beitragen (Pollard et al., 2000). Eines dieser G-Aktin-bindenden Proteine ist Profilin, das im Folgenden detaillierter beschrieben werden soll.

2. Profilin

Profilin wurde ursprünglich von Carlsson et al. (1977) als G-Aktin-bindendes Protein beschrieben. Bis heute ist seine biologische Funktion nicht vollständig aufgeklärt. Das 12 bis 15 kDa große Protein wurde in allen bisher untersuchten Eukaryonten, wie Protozoen, Hefen, Pflanzen, Insekten und Mammalia, nachgewiesen und gilt allgemein als ubiquitär exprimiertes Protein (Haarer and Brown, 1990; Sohn and Goldschmidt-Clermont, 1994; Sun et al., 1995). Das Ausschalten des Profilin I-Gens, mittels der “Knock-Out-Technik“ in Mäusen zeigte, dass es sich um ein essentielles Protein handelt, da homozygote Embryonen im 4-Zell-Stadium sterben (Witke et al., 2001). Auch bei *Drosophila melanogaster* sind Mutationen im Profilin-Gen letal (Verheyen and Cooley, 1994).

Zur Zeit sind vier Profilin-Isoformen bekannt: Profilin I ist ubiquitär in allen Geweben, jedoch in unterschiedlichen Mengen nachweisbar, während die Isoformen IIa, IIb und III gewebespezifisch exprimiert werden (Honore et al., 1993). Das Profilin II-Gen wird alternativ zu Profilin IIa und IIb gespleisst, wobei Profilin IIa ausschließlich in neuronalem Gewebe und Profilin IIb in Niere, Haut und Leber auftritt (Di Nardo et al., 2000; Lambrechts et al., 2000). Das Gen für die Isoform III wurde erst vor kurzem kloniert und dessen Expression beschränkt sich auf Hodengewebe (Braun et al., 2002; Hu et al., 2001).

Einige Organismen zeigen entwicklungsabhängige Expressionen der verschiedenen Profilin-Isoformen, so wird z.B. während der Mausentwicklung Profilin I konstant exprimiert, wohingegen der Expressionslevel von Profilin IIa sowohl in den späten Entwicklungsstadien des Embryos als auch postnatal stark ansteigt (Di Nardo et al., 2000). In *Dictyostelium discoideum* sind ebenfalls unterschiedliche Expressionsspiegel der Isoformen I und II während der Entwicklung beschrieben worden (Haugwitz et al., 1991).

Die molekulare Struktur der Profiline aus unterschiedlichen Spezies ist nahezu identisch, obwohl die Homologie der Aminosäuresequenz auffällig gering ist (<30%). Die Struktur von Profilin (siehe Abbildung 2) besteht aus einem zentralen β -Faltblatt, das aus 6 bis 7 antiparallelen Strängen besteht. Flankiert wird das Faltblatt auf der einen Seite von zwei terminalen α -Helices und auf der gegenüberliegenden Seite von zwei weiteren α -Helices oder β -Faltblättern (Spezies-abhängig) (Fedorov et al., 1994; Schutt et al., 1993).

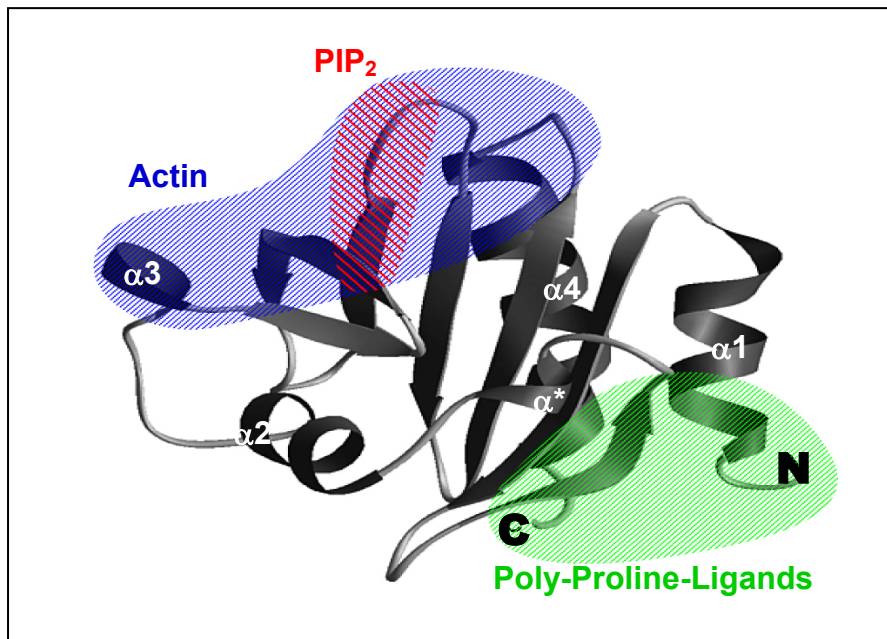


Abb.2: Struktur von Profilin und Bindungsregionen von Aktin, PIP₂ und Poly-Prolin-Liganden. Rinder-Profilin-Struktur nach Schutt et al., 1993, Bindungsstellen für Aktin nach Schutt et al., 1993, für PIP₂ nach Sohn et al., 1995 und für Poly-Prolin nach Metzler et al., 1994 (aus Schluter et al., 1997).

Die Profiline weisen trotz der geringern Sequenzhomologie gleiche biochemische Eigenschaften auf: Sie binden fast alle an G-Aktin (Carlsson et al., 1977), an Phospholipide wie Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (Lassing and Lindberg, 1985) und interagieren mit Poly-L-Prolin bzw. Proteinen, die Poly-Prolin-Motive enthalten (Kaiser et al., 1989). Generell gibt es Unterschiede in der Affinität zu G-Aktin, so bindet Profilin I stärker an Aktin als Profilin II. Funktionelle Unterschiede gibt es auch bei der Wechselwirkung von Profilin mit Poly-Prolin-Liganden: Profilin IIa bindet stärker an Poly-Prolin als Profilin I (Gieselmann et al., 1995). Bei der Isoform IIa ist das Serin 29 gegen ein Tyrosin ausgetauscht, was die stärkere Bindung von Profilin IIa an Poly-Prolin erklären kann (Nodelman et al., 1999). Diese Unterschiede konnten auch in unserer Arbeitsgruppe bestätigt werden (Wittenmayer et al., 2000).

Maus Profilin IIb bindet nicht mehr an G-Aktin und die Interaktion mit Poly-Prolin-Liganden ist stark geschwächt (Di Nardo et al., 2000). Jedoch interagiert humanes Profilin IIb mit G-Aktin und die Wechselwirkung mit Poly-Prolin-Liganden, wie VASP, ist nicht beeinflusst (Wittenmayer et al., 2000). Der C-Terminus von Maus Profilin IIb hat zusätzliche sechs Aminosäuren im Vergleich zum humanen Profilin IIb, was das geänderte Bindungsverhalten durch strukturelle Unterschiede im C-Terminus erklären kann.

2.1 Die Wechselwirkung mit Aktin

Profilin bindet an globuläres Aktin stöchiometrisch in einem 1:1-Komplex. Mutationsanalysen und biochemische Experimente führten zu ersten Erkenntnissen über die Aktin-Bindungsstelle am Profilinmolekül. Später wurde die Struktur von Rinder-Profilin im Komplex mit β -Aktin von Schutt et al. (1993) aufgeklärt. Am Aktinmolekül ist der C-Terminus (Subdomäne 1) von entscheidender Bedeutung für die Stabilität des Profilin-Aktin-Komplexes. Durch die proteolytische Abspaltung des Phenylalanins 375 am C-Terminus wird der Profilin-Aktin-Komplex stark geschwächt (Malm et al., 1983) und Mutationsanalysen des Phenylalanin 375 unterstützten die Annahme, dass diese Aminosäure eine zentrale Bedeutung bei dieser Interaktion hat (Aspenstrom et al., 1993). Die Quervernetzung von *Acanthamoeba*-Profilin mit Aktin zwischen den Aminosäuren Lysin 115 (Profilin) und Glutamat 364 (Aktin) erlaubte weitere Rückschlüsse auf die Beteiligung des C-Terminus an der Interaktion (Vandekerckhove et al., 1989). Die Kokristallisation durch Schutt et al. (1993) zeigte, dass die Bindung von Profilin an Aktin durch die Helix 3, den β -Faltblatt-Strängen 4, 5, 6 und dem N-terminalen Bereich der Helix 4 des Profilins an die Subdomänen 1 und 3 des Aktins vermittelt wird. Bei dieser Interaktion ist das Phenylalanin 375 (Aktin) ebenfalls von Bedeutung, da es mit einer Reihe von Aminosäuren des Profilins eine hydrophobe Wechselwirkung eingeht. Mehrere Histidine sind ferner an dieser Kontaktbildung beteiligt, was die pH-Abhängigkeit des Komplexes erklärt (Carlsson, Dissertation, 1979). Außerdem gibt es einen zweiten Kontaktbereich zwischen Profilin und Aktin, welcher von der N-terminalen Helix Profilins und der Subdomäne 4 Aktins vermittelt wird. Diesem wird aber bei der Komplexbildung eine untergeordnete Rolle zugeordnet, da die erstgenannte Kontaktregion mit 2250 \AA^2 einen wesentlich größeren Kontaktbereich darstellt.

Abbildung 3 zeigt den Mechanismus der Aktinpolymerisation mit Beteiligung von Profilin.

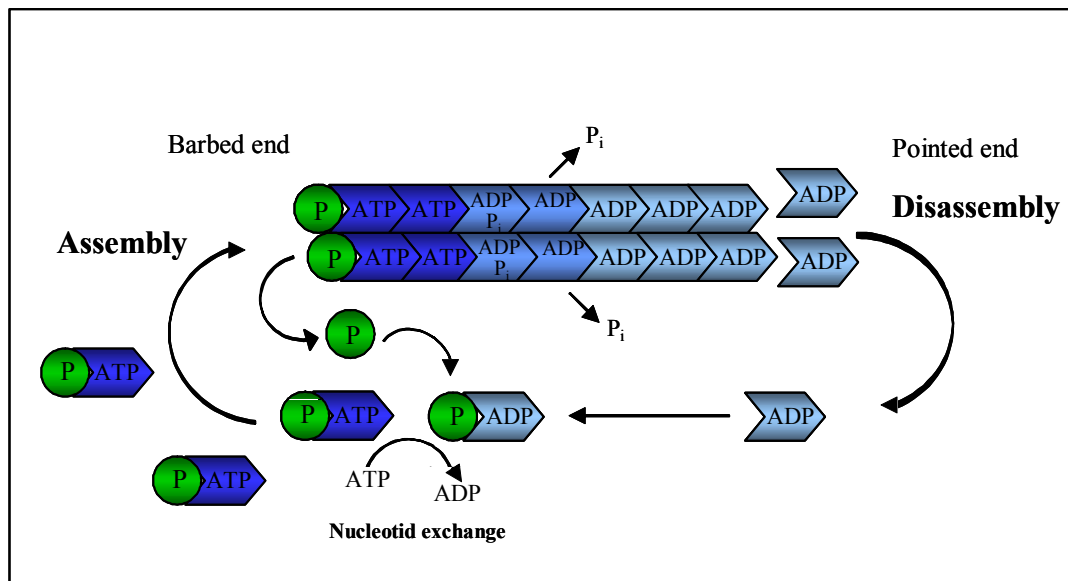


Abb.3: Schematische Darstellung der Aktinpolymerisation mit Beteiligung von Profilin (P).

Aktinpolymerisation findet statt, indem Profilin-Aktin-Komplexe an das Plus-Ende des polaren Filaments angelagert werden, Profilin dissoziiert vom Filament und das ATP wird durch die ATPase-Aktivität des Aktins hydrolysiert. Die daraus resultierende Konformationsänderung des Aktins bewirkt die Dissoziation des ADP-Aktins am Minus-Ende des Filaments. Profilin fördert den Nukleotidaustausch (ADP zu ATP) am G-Aktin-Molekül (frei nach (Holt and Koffer, 2001)).

Ausgangspunkte für die Polymerisation sind Aktintrimere, sog. Nukleationskeime, an die weitere ATP-Aktin-Moleküle angelagert werden. Es folgt eine Phase der schnellen Polymerisation, bis eine Gleichgewichtsphase erreicht ist. Die sog. kritische Konzentration beschreibt die Aktin-Monomer-Konzentration, bei der der Anteil des Aktins im Polymer nicht weiter zunimmt und Assoziation und Dissoziation der Monomere am Filament sich im Gleichgewicht befinden. Die entstehenden Filamente bestehen aus einer rechts gewundenen Helix mit einer Ganghöhe von 70 nm. Der Einbau von Aktinmonomeren erfolgt in gleicher Orientierung, wodurch Filamente mit einer strukturellen Polarität entstehen (Ishikawa et al., 1969). Die Polarität der Helix wird auch durch eine Konformationsänderung des Aktins (Pollard et al., 1994) in der Subdomäne 2 nach Hydrolyse des ATP hervorgerufen, wie Kristallisationsstudien zeigen konnten (Otterbein et al., 2001). Es entsteht am Filament ein Plus-Ende („barbed end“) und ein Minus-Ende („pointed end“). Nach der ATP-Hydrolyse vermindert sich die Affinität des ADP-Aktin-Moleküls zum F-Aktin und es dissoziiert am Minus-Ende ab. Anschließend wird das ADP am Molekül gegen ATP ausgetauscht und das Monomer steht für die Assoziation an das Filament bereit. Der Einbau erfolgt am Plus-Ende des Filaments, wodurch es zu einem stetigen Fluss an Molekülen durch das Filament kommt.

Dieses Modell bezeichnet man als Tretmühlenmechanismus. Es wurde mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Aktinmonomere auch optisch sichtbar gemacht (Fujiwara et al., 2002b; Pollard and Borisy, 2003).

Profilin zeigt *in vitro* eine polymerisationsfördernde Funktion, so ist es in der Lage den Nukleotid- und den Kationen-Austausch am Aktin zu erhöhen (Abbildung 3) (Goldschmidt-Clermont et al., 1992; Perelroizen et al., 1995). Die Austauschrate des Nukleotids am Aktinmolekül wird um den Faktor 140 durch die Komplexbildung mit Profilin gesteigert (Selden et al., 1999) und da in der Zelle ATP im Überschuss vorliegt, wird der Austausch des Nukleotids in der Regel zugunsten von ATP-Aktin verlaufen. Darüber hinaus wird durch die Bindung von Profilin an Aktin die ATPase-Aktivität des Aktins gehemmt (Tobacman and Korn, 1982). Demzufolge liegen durch Komplexbildung mit Profilin vermehrt ATP-Aktin-Moleküle für den Einbau in das Filament vor, was die Polymerisation von Aktinfilamenten fördert. Eine weitere polymerisationsunterstützende Funktion des Profilins wurde von Pantaloni & Carlier (1993) beschrieben. Profilin-Aktin-Komplexe werden direkt an die Plus-Enden von Aktinfilamenten, mit anschließender Dissoziation des Profilins vom Filament, addiert (Pollard and Cooper, 1984; Pring et al., 1992; Tilney et al., 1983). Dabei ist die Affinität für den Profilin-Aktin-Komplex am Plus-Ende höher als für Aktin allein, wodurch die kritische Konzentration für Aktin herabgesetzt wird (Carlier et al., 1993; Pantaloni and Carlier, 1993; Pollard and Cooper, 1984). Die Verwendung von chemisch vernetzten Profilin-Aktin-Komplexen zeigte *in vitro*, dass die Nukleation und Elongation von Aktinfilamenten verhindert wurde (Nyman et al., 2002). Das spricht ebenfalls für einen Polymerisations-Mechanismus, bei dem Profilin-Aktin-Komplexe an das Plus-Ende addiert werden, gefolgt von der Dissoziation des Profilins vom Aktinfilament.

Mittlerweile ist bekannt, dass über die Aktinbindungsregion am Profilinmolekül noch weitere Proteine mit Profilin interagieren. Aus *Acanthamoeba castellanii* wurde ein Proteinkomplex gereinigt, der an Profilin bindet und zwei unkonventionelle Aktine („actin-related protein“, ARP) enthält (Machesky et al., 1994). Dieser Proteinkomplex, der Arp2/3 Komplex, besteht aus sieben Untereinheiten, von denen das Arp2 mit Profilin interagiert (Mullins et al., 1998). Der Arp2/3 Komplex kann nach Aktivierung neue Aktinfilamente nukleieren und zusätzlich Y-Verzweigungen an bestehenden Aktinfilamenten ausbilden (Mullins and Pollard, 1999). Dadurch entstehen verzweigte Netzwerke aus Aktinfilamenten, die für die Ausbildung des Lamellipodiums benötigt werden und an der Zellperipherie die Membran vorwärts schieben (Machesky and Gould, 1999; Mullins et al., 1998; Pollard and Borisy, 2003; Welch, 1999).

Zur Zeit werden zwei Modelle für den Mechanismus der Nukleation und der Filamentverzweigung durch den Arp2/3 Komplex diskutiert (Abb.4). Das Modell der „dendritic nucleation“ besagt, dass der Arp2/3 Komplex seitlich an ein bereits vorhandenes Aktinfilament bindet und dort ein abzweigendes, neues Filament nukleiert (Pollard et al., 2000). Beim Modell des „barbed end branching“ geht man davon aus, dass der Arp2/3 Komplex an freie „barbed ends“ bindet und dort zwei neue Filamente mit einem Winkel von 70° generiert (Pantaloni et al., 2000). Es ist bislang nicht geklärt, welches Modell tatsächlich *in vivo* existiert, jedoch könnten beide Modelle auch nebeneinander in der Zelle ablaufen (Fujiwara et al., 2002a).

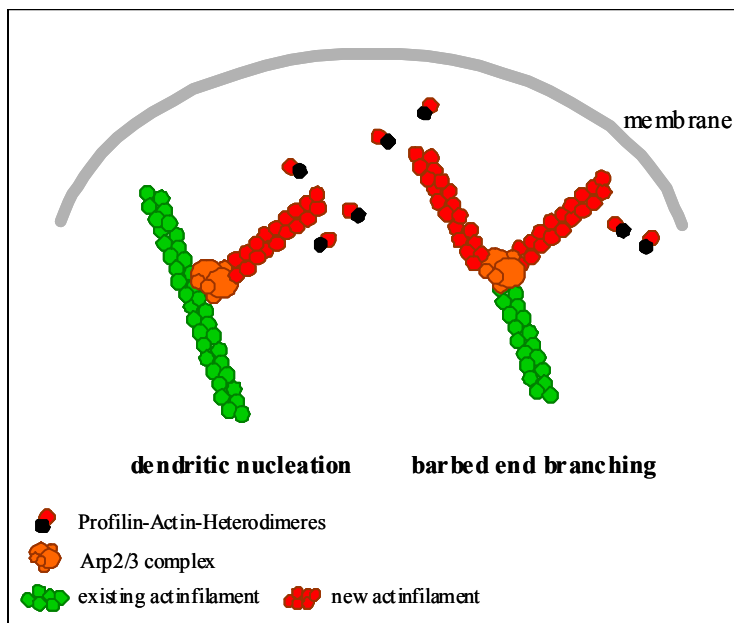


Abb. 4: Darstellung der Verzweigungsmodelle durch den Arp2/3 Komplex.

Bei dem Modell „dendritic nucleation“ bindet der Arp2/3 Komplex seitlich an ein existierendes Aktinfilament und nukleiert ein neues Filament. Beim „barbed end branching“ besetzt der Komplex die Plus-Enden von Aktinfilamenten und erzeugt eine Gabelung, aus der zwei neue Filamente hervorgehen. Profilin-Aktin-Komplexe werden an die wachsenden Plus-Enden addiert.

(frei nach (Condeelis, 2001))

In unserer Arbeitsgruppe konnte kürzlich gezeigt werden, dass ein weiteres Protein über die Aktinbindungsregion mit Profilin interagiert (Giesemann et al., in press). Das Protein Gephyrin ist ein bifunktionelles Protein, welches einerseits in der Molybdän-Kofaktor-Synthese den Einbau des Molybdats in das Molybdopterin katalysiert (Stallmeyer et al., 1995). Beim Menschen führt die Mutation des Gephyrin-Gens zu einer Molybdän-Kofaktor-Mangelerkrankung (Reiss et al., 2001), welche letal ist. Andererseits ist Gephyrin in neuronalen Zellen an der Aggregation inhibitorischer Rezeptoren an der postsynaptischen Membran beteiligt. Das Protein ist ein peripheres Membranprotein und verankert über die Wechselwirkung mit dem Cytoskelett die Rezeptorkomplexe (Kirsch et al., 1995). Die Dichte der Rezeptoren hat bei der Reizleitung im zentralen Nervensystem durch Neurotransmitter einen starken Einfluss auf die Signalstärke (Lim et al., 1999).

Gephyrin wurde ursprünglich als Poly-Prolin-Ligand von Profilin beschrieben (Mammoto et al., 1998). Torsten Giesemann konnte mit Gephyrin-Deletionsfragmenten und

Verdrängungsstudien zeigen, dass Gephyrin mit Aktin um die Bindung an Profilin konkurriert. Zusätzlich kann PIP₂ Profilin aus dem Komplex mit Gephyrin verdrängen, was mit den überlappenden Bindungsstellen für Aktin und PIP₂ am Profilinmolekül zu erklären ist. Darüber hinaus wurde VASP als weiterer Ligand von Gephyrin identifiziert (Giesemann et al., in press). Das Aktin-Cytoskelett ist an der Bildung und räumlichen Organisation der Gephyrin-Aggregate beteiligt und das Zusammenspiel von Profilin, Aktin und VASP könnte zur Modulation der Gephyrin-Aggregate beitragen.

2.2 Die Wechselwirkung mit Poly-Prolin

Die Wechselwirkung von Profilin mit Poly-Prolin wird für die Präparation des Proteins mittels Affinitätschromatographie seit Jahren genutzt (Lindberg et al., 1988; Tanaka and Shibata, 1985). Mit der Identifikation des „vasodilator stimulated phosphoprotein“ (VASP) als erstem Poly-Prolin-Ligand von Profilin erhielt diese Wechselwirkung erstmals eine biologische Bedeutung (Reinhard et al., 1995a). VASP interagiert über eine prolinreiche Region mit Profilin, die sich aus einem einzelnen und drei aufeinander folgenden GP₅-Motiven zusammensetzt (Haffner et al., 1995). Für die Interaktion mit Profilin typische prolinreiche Regionen umfassen sechs Proline, jedoch vermitteln acht bis zehn Proline stärkere Wechselwirkungen (Lambrechts et al., 1997; Perelroizen et al., 1994). Das Bindungsmotiv kann durch ein Glycin unterbrochen sein, so dass sich wie bei VASP ein GP₅-Motiv ergibt (Purich and Southwick, 1997). Mittlerweile sind zahlreiche Proteine identifiziert worden, die über prolinreiche Sequenzen an Profilin binden, wie andere Mitglieder der Ena/VASP Proteinfamilie, WASP, WIP, „survival motor neuron protein“ (SMN), p42POP und einige Formin-ähnliche Proteine, wie p140mDia oder Cappuccino (Ahern-Djamali et al., 1999; Chang et al., 1997; Evangelista et al., 1997; Gertler et al., 1996; Giesemann et al., 1999; Krebs et al., 2001; Manseau et al., 1996; Ramesh et al., 1997; Suetsugu et al., 1998; Wang et al., 1999; Watanabe et al., 1997). Viele dieser Proteine sind in Signaltransduktionskaskaden involviert, die zelluläre Signale in gerichtete Aktinpolymerisation umsetzen.

p140mDia gehört zu den Formin-ähnlichen Proteinen, die mit den kleinen GTPasen Rho, Rac oder Cdc42 interagieren und durch Rekrutierung von Profilin-Aktin-Komplexen zur Aktinfilamentbildung beitragen (Krebs et al., 2001; Watanabe et al., 1997). Da immer mehr Poly-Prolin-Liganden für Profilin identifiziert werden, ist die funktionelle Bedeutung bei der Komplexbildung mit solchen Partnern immer noch nicht geklärt.

Die Bindungsstelle für Poly-Prolin-Liganden am Profilin besteht aus einem hochkonservierten, hydrophoben Bereich zwischen den N- und C-terminalen Helices, an dem die Aminosäuren Tryptophan 3, Tyrosin 6, Tryptophan 31, Histidin 133, Leucin 134 und Tyrosin 139 beteiligt sind (Archer et al., 1994). Mutationsanalysen haben diese Ergebnisse unterstützt: nach Einführung der Mutationen H133S und W3N ist keine Poly-Prolin-Bindung mehr messbar (Bjorkegren et al., 1993) und Deletionen am C-Terminus des Profilins führen ebenfalls zum Verlust der Bindung (Haarer et al., 1993). Die Poly-Prolin-Bindungsstelle liegt am Profilin auf der gegenüberliegenden Seite der Aktin/PIP₂-Bindungsregion (siehe Abb.2). Aufgrund der strukturellen Distanz sind die Affinitäten für Aktin oder PIP₂ durch die Bindung eines Poly-Prolin-Liganden nicht beeinflusst (Archer et al., 1994; Kaiser et al., 1989; Perelroizen et al., 1994).

2.3 Die Wechselwirkung mit Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat

Die Interaktion von Aktin-bindenden Proteinen mit Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) beruht in der Regel auf der Wechselwirkung der negativ geladenen Phospholipid-Kopfgruppen mit den basischen Aminogruppen des Proteins. Damit lassen sich die abweichenden Affinitäten der verschiedenen Profilin-Isoformen für PIP₂ begründen. Das *Acanthamoeba* Profilin II bindet stärker an PIP₂ und ist basischer als die Isoform I (Machesky et al., 1990). Humanes Profilin I ist ebenfalls unter physiologischen Bedingungen stärker positiv geladen und damit auch affiner für PIP₂ als humanes Profilin IIa (Lambrechts et al., 1997). Die Wechselwirkung von PIP₂ mit Profilin ist stärker als die mit Aktin, so dass die Bindung von PIP₂ zur Dissoziation des Profilin-Aktin-Komplexes führt (Lassing and Lindberg, 1985).

Bis heute ist aber die PIP₂-Bindungsregion am Profilin nicht eindeutig identifiziert. Basierend auf der Röntgenstrukturanalyse von *Acanthamoeba* Profilin wurde ein basischer Bereich im Profilinmolekül als Bindungsstelle vorgeschlagen (Abb. 2), der die Arginin-Reste 56, 66 und 71 und die Lysin-Reste 80, 81 und 115 (bei Mensch: 74, 88, 90 und 125) umfasst (Fedorov et al., 1994). Dieser Bereich überlappt mit der Aktin-Bindungsstelle, was die Konkurrenz zwischen Aktin und PIP₂ für die Bindung an Profilin erklären kann (Lassing and Lindberg, 1985). Durch weitere Studien mittels Punktmutationen wurde die Hypothese von der postulierten Überlappung der Aktin/PIP₂-Bindungsregion bestärkt. Im humanen Profilin I wurde der Bereich um Arginin 88 als PIP₂-Bindungsregion definiert, da insbesondere die

Mutation R88L eine abnehmende Inhibition der PIP₂-Hydrolyse durch PLC γ hervorrief (Sohn et al., 1995). Die Wechselwirkung von PIP₂ mit Profilin wurde durch die Mutation von Arginin 72 zu Glutaminsäure in der Hefe (in Mammalia: Arginin 74) geschwächt, so dass dieser Aminosäurerest ebenfalls eine zentrale Rolle spielt (Haarer et al., 1993).

Wie sich in jüngeren Studien gezeigt hat, scheint auch die C-terminale Helix des Profilins zur Bindung an PIP₂ beizutragen. Mutationen in der N-terminalen Helix sowie des Arginins 136 führten zu einer Schwächung der PIP₂-Bindung, so dass eine zweite Bindungsregion für PIP₂ am Profilinmolekül postuliert wurde (Lambrechts et al., 2002; Skare and Karlsson, 2002). Diese Region überlappt mit der Poly-Prolin-Bindungsstelle, was von geschwächten Interaktionen mit Poly-Prolin-Liganden gestützt wird (Lambrechts et al., 2002). Des Weiteren kann PIP₂ Poly-Prolin-Peptide vom Profilin verdrängen, wodurch PIP₂ eine tragende Rolle in der Regulation von Profilin in der Zelle erhält (Lambrechts et al., 1997).

Im Übrigen gibt es weitere Bindungspartner von Profilin, wie p85, die regulatorische Untereinheit der Phosphoinositid (PI) 3-Kinase, für die die Bindungsregion am Profilinmolekül noch nicht kartiert wurden (Singh et al., 1996a).

Tab. I.1: Profilinmutanten und ihre Liganden-Bindungsfähigkeiten

Protein	Aktin-Bindung: K _d -Wert	PLP-Bindung: Elutionsverhalten an einer PLP-Säule	PIP ₂ -Bindung: unterschiedliche Versuche
Wildtyp Profilin I	2 x 10 ⁻⁶ M ¹	Elution mit 6-8 M Harnstoff ¹	100% ¹
PFNI/Y59A	60 x 10 ⁻⁶ M ¹	Elution mit 6-8 M Harnstoff ¹	wie Wildtyp (Dot-Overlay)
PFNI/H133S	1,25 x 10 ⁻⁶ M ¹	Keine Bindung ¹	wie Wildtyp (Gelfiltration mit PIP ₂ -Micellen ²)
PFNI/R88L	4 x 10 ⁻⁶ M ¹	Elution mit 6-8 M Harnstoff ¹	weniger als 30% im Vgl. zum Wildtyp (Aktivität d. Phospholipase ³)

PLP: Poly-L-Prolin

¹ Dr. K. Schlüter, persönliche Mitteilung

² aus (Bjorkegren-Sjogren et al., 1997)

³ aus (Sohn et al., 1995)

Mittlerweile sind eine Vielzahl von Profilinmutanten aus unterschiedlichen Spezies generiert und teilweise biochemisch charakterisiert worden (Lu and Pollard, 2001). Aufgrund der geringen Größe des Profilins und überlappender Bindungsregionen am Profilinmolekül sind

bei vielen Profilinmutanten mehrere Liganden-Bindungsfähigkeiten von der jeweiligen Mutation betroffen (Bjorkegren-Sjogren et al., 1997). Versuchsergebnisse müssen unter Berücksichtigung dieser Beeinflussungen betrachtet werden. In Tabelle I.1 sind die hier verwendeten Profilinmutanten und ihre Liganden-Bindungsfähigkeiten aufgelistet.

2.4 Die zelluläre Funktion von Profilin

Eine wesentliche Funktion von Profilin in Zellen liegt in der Vermittlung zwischen Signaltransduktion und dem Aktin-Cytoskelett (Sohn and Goldschmidt-Clermont, 1994; Sun et al., 1995; Theriot and Mitchison, 1993). Man dachte anfangs, dass Profilin den Pool an G-Aktin in der Zelle aufgrund seiner G-Aktin-bindenden Eigenschaft, stabilisiert. Diese Rolle wird mittlerweile in Säugerzellen Thymosin β 4 zugeschrieben, welches sowohl eine höhere Affinität für G-Aktin hat als auch in der notwendigen Konzentration in der Zelle vorliegt (Carlier et al., 1993; Pantaloni and Carlier, 1993; Safer et al., 1991). *In vitro* Daten belegen eine polymerisationsfördernde Funktion für Profilin, welche sich aufgrund der zellulären Lokalisation von Profilin auch in der Zelle vermuten lässt (siehe Abb.5).

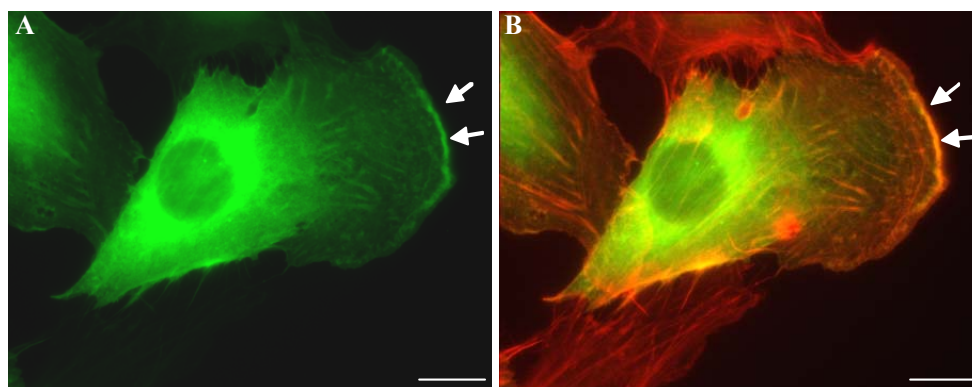


Abb.5: Lokalisation von Profilin und Darstellung des Aktin-Cytoskelett in einer Fibroblastenzelle. NIH-3T3-Zellen wurden transient mit GFP-fusioniertem Profilin I transfiziert und das Aktin-Cytoskelett wurde durch Dekoration mit Phalloidin-TRITC dargestellt. Deutlich ist die Anreicherung des Profilins in den „ruffles“ des Lamellipodium (\leftarrow) zu erkennen. A zeigt die zelluläre Lokalisation des GFP-Profilins in grün und B zeigt zusätzlich F-Aktin in rot. Der Balken entspricht 10 μ m.

Kolokalisationsexperimente haben ergeben, dass Profilin in Regionen mit hoher Aktindynamik lokalisiert (Geese et al., 2000; Mayboroda et al., 1997; Neely and Macaluso, 1997). In unserer Arbeitsgruppe zeigte Folma Buß, dass Profilin in Fibroblastenzellen in hochdynamischen Bereichen, wie dem Lamellipodium angereichert ist (Buss et al., 1992). Die Mikroinjektion von Profilin-Aktin-Komplexen in Säugerzellen führt zu einer Zunahme des F-Aktingehalts und zu vermehrtem „ruffling“ der Zellen (Cao et al., 1992). Eine Kolokalisation

mit dynamischen Aktinfilamenten ist ebenfalls für die durch Serumentzug induzierbaren Aktinfilamente in BHK-21 Zellen beschrieben worden (Rothkegel et al., 1996). Des Weiteren ist die Stabilität des F-Aktins positiv korreliert mit dem Profilengehalt (Finkel et al., 1994) und die Überexpression von Pflanzenprofilin in Säugerzellen bewirkte eine zunehmende Stabilität der F-Aktin-Strukturen gegenüber Zellgiften, wie Cytochalasin D (Rothkegel et al., 1996).

Humanpathogene Bakterien wie *Listeria monocytogenes* und *Shigella flexneri* benutzen das Mikrofilamentsystem der Säugerzellen, um sich in der Zelle fortzubewegen. Dabei rekrutiert *Listeria* Komponenten des Mikrofilamentsystems der Wirtszelle: durch gerichtete Aktinpolymerisation an einem Bakterienpol entsteht ein Schweif aus Aktinfilamenten, der das Bakterium durch das Cytoplasma der Wirtszelle treibt. *Listeria* exprimiert das Oberflächenprotein ActA, das unter anderem mit Aktin, VASP und dem Arp2/3-Komplex interagiert (Niebuhr et al., 1997; Welch et al., 1998). Es kommt zur Aktivierung des Arp2/3-Komplexes durch ActA, was zur Nukleation von Aktinfilamenten führt. ActA rekrutiert Ena/VASP-Proteine, die wiederum Profilin-Aktin-Komplexe rekrutieren und es kommt zur Polymerisation von Aktinfilamenten (Niebuhr et al., 1997; Pistor et al., 1995). Die Geschwindigkeit der Bakterien korreliert mit der Profilinkonzentration am Bakterienpol (Geese et al., 2000) und die Depletion von Profilin oder VASP führt zu einer starken Reduktion der Aktin-vermittelten Listerienmotilität (Laurent et al., 1999; Theriot et al., 1994). Versuche mit chemisch vernetzten Profilin-Aktin-Komplexen demonstrierten, dass die Motilität von Listerien dramatisch reduziert wurde. Dabei blockierten die Profilin-Aktin-Komplexe nicht die Initiation des Aktinschweifes, so dass man annehmen kann, dass Profilin-Aktin-Komplexe nur für die Elongation der Filamente benötigt werden (Grenklo et al., 2003). Dieses Modell berücksichtigt nicht alle Komponenten der Wirtszelle, aber es zeigt deutlich, dass Profilin an der Aktinfilamentbildung beteiligt ist.

Eine Vielzahl von Profilinmutanten, die nicht mehr an G-Aktin binden, wurden mittlerweile erstellt und *in vitro* wie auch *in vivo* untersucht. Die Expression der Mutanten H119E, die in ihrer Affinität für Aktin gestört ist, suppressierte die Formierung von F-Aktin-Strukturen in „mikrospikes“ von Fibroblastenzellen (Suetsugu et al., 1998). Profilin-defiziente *Dictyostelium*-Zellen zeigen im Vergleich zu Wildtyp-Profilin einen stark reduzierten „Rescue“-Effekt nach Expression der Profilinmutante F59A, was den Einfluss von Profilin auf Aktin-basierende Prozesse wie Lokomotion und Proliferation von Zellen demonstriert (Schluter et al., 1998). Die Mikroinjektion von Profilinmutanten (P96 Δ , T97 Δ aus Hefe) in Säugerzellen bewirkte keine Umorganisation des Cytoskeletts, im Gegensatz zum injizierten

Wildtyp-Profilin (Hajkova et al., 1997). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die zelluläre Funktion von Profilin in der Regulation des Mikrofilamentsystems liegt und dass die Aktinbindung für die Funktionalität Profilins wichtig ist.

Profilin ist aufgrund seiner Wechselwirkung mit PIP_2 mit dem Phosphoinositid-Signalweg verknüpft (Abb.6).

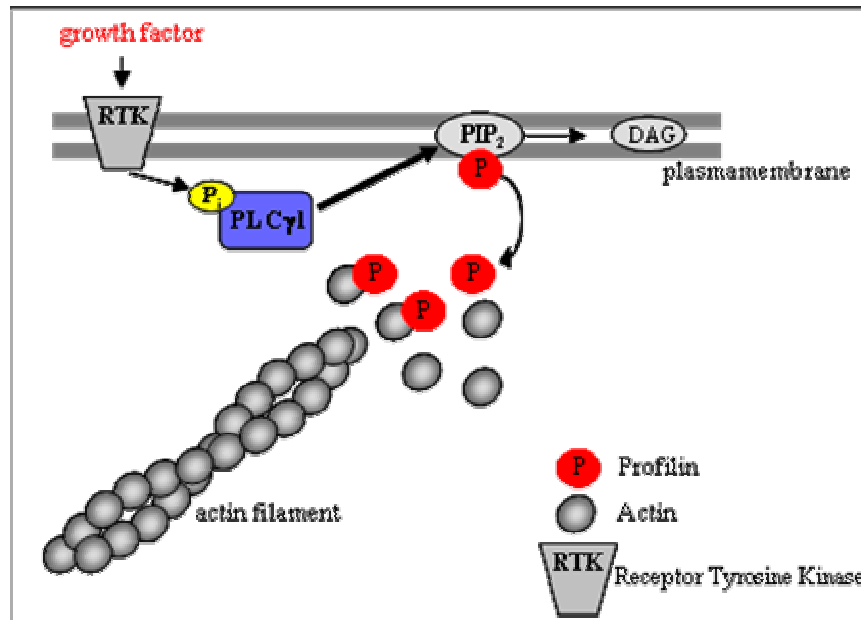


Abb. 6: Postulierte PIP_2 -abhängige Regulation von Profilin.

Profilin liegt an PIP_2 gebunden in der Zelle vor. Wachstumsfaktoren aktivieren Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, die wiederum die Phospholipase $\text{C}\gamma 1$ phosphorylieren. Das aktivierte Enzym spaltet PIP_2 in Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP_3), wobei Profilin frei wird und lokal die Polymerisation von Aktin fördern kann (frei nach Schluter et al., 1997).

Profilin-gebundenes PIP_2 kann nicht mehr durch die Phospholipase $\text{C}\gamma 1$ in Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP_3) gespalten werden. Erst nach Aktivierung der Phospholipase durch Phosphorylierung wird PIP_2 gespalten und Profilin aus dem Komplex entlassen (Goldschmidt-Clermont et al., 1991). Die Phospholipase $\text{C}\gamma 1$ ist ein Substrat der Rezeptor-Tyrosin-Kinase, ein Zelloberflächenrezeptor, welcher durch Wachstumsfaktoren aktiviert wird. Die „second messenger“ Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) bewirken die Freisetzung von Ca^{2+} ins Cytoplasma, was zur Aktivierung von weiteren Calcium-abhängigen Proteinen führt. Das aus dem Komplex entlassene Profilin kann lokal regulierend auf die Aktinfilamentbildung wirken. Die Lokalisation von Profilin an der Plasmamembran konnte in stationären Leukozyten und Fibroblasten gezeigt werden (Buss et al., 1992; Hartwig et al., 1989). Ostrander und Mitarbeiter belegten, dass die Assoziation von

Profilin mit der Plasmamembran vom Phosphoinositid-Stoffwechsel abhängig ist (Ostrander et al., 1995).

Die Modulation des Mikrofilamentsystem durch PIP₂ wurde in mehreren Studien belegt. Die Inhibierung von PIP₂ durch Antikörper führt zur Reduktion von Stressfasern und Fokalkontakten in Fibroblasten (Gilmore and Burridge, 1996b). Auch die Hydrolyse von PIP₂ durch Synaptojanin resultiert in eine Abnahme von Stressfasern und anderen Veränderungen des Mikrofilamentsystems (Sakisaka et al., 1997). Zusätzlich lokalisiert PIP₂ in Bereichen der Zellmembran mit hoher Aktindynamik, wie in den „ruffles“ von EGF-stimulierten Zellen (Tall et al., 2000). PIP₂ kann mit einer Reihe von Aktin-bindenden Proteinen wie N-WASP, Vinculin oder Proteinen der Ezrin/Radixin/Moesin-Familie (ERM) interagieren und löst Konformationsänderungen dieser Proteine aus (Gilmore and Burridge, 1996a; Rohatgi et al., 2000; Sechi and Wehland, 2000). Durch die Konformationsänderungen werden Ligandenbindungsdomänen freigelegt und weitere Signalwege aktiviert, die zu gerichteter Aktinpolymerisation führen. Hierbei handelt es sich um einen möglichen Mechanismus bei dem PIP₂ regulativ auf die Organisation des Mikrofilamentsystems wirkt (Huttelmaier et al., 1998).

Die postulierte PIP₂-Bindungsregion am Profilinmolekül überlappt mit der Aktin-Bindungsstelle (Abb.2), so dass PIP₂ zur Dissoziation des Profilin-Aktin-Komplexes führt (Lassing and Lindberg, 1985). Ferner beeinflusst die Bindung von PIP₂ an Profilin auch die Bindung von Poly-Prolin-Liganden (Lambrechts et al., 1997). Überlappende Aktin- und PIP₂-Bindungsregionen wurden auch für Proteine, wie Actophorin oder Gelsolin beschrieben (Van Troys et al., 2000; Yin et al., 1988; Yu et al., 1992). Möglicherweise handelt es sich hier um einen weiteren regulativen Mechanismus für Aktin-bindende Proteine. Ihre Funktion ist inhibiert, solange sie an PIP₂ gebunden sind. Erst nach Aktivierung der Phospholipase C γ 1 durch Wachstumsfaktoren erfolgt die PIP₂-Hydrolyse und Proteine wie Profilin werden freigesetzt und können die Organisation des Aktin-Cytoskeletts beeinflussen.

Mittels *in vitro* Studien wurde eine PKC-abhängige Phosphorylierung von Serin 138 des Rinderprofilins nachgewiesen (Singh et al., 1996b; Vemuri and Singh, 2001). Diese Aminosäure ist stark konserviert und liegt innerhalb der Poly-Prolin-Bindungsregion, so dass die Phosphorylierung die Interaktion mit Poly-Prolin-Liganden modulieren kann. Es könnte sich hierbei generell um einen Regulationsmechanismus der Zelle für die Interaktion von Profilin mit Poly-Prolin-Liganden handeln. Die Rekrutierung und Entlassung von Profilin-Aktin-Komplexen durch Poly-Prolin-Liganden in zellulären Bereichen mit hoher

Aktindynamik bedarf einer schnellen Regulation, welche möglicherweise durch die Phosphorylierung von Profilin gewährleistet sein könnte.

Zusätzlich lokalisiert Profilin im Zellkern eukaryontischer Zellen (Mayboroda et al., 1997) und ist dort in Strukturen, wie den „Cajal bodies“ angereichert (Giesemann et al., 1999; Skare et al., 2003). Diese Kernstrukturen enthalten Transkriptionsfaktoren, Zellzyklusfaktoren und „splicing ribonucleoproteins“ und sind an dem intranukleären Transport und der Regulation der Genexpression beteiligt. Das SMN-Protein wurde als kernständiger Ligand von Profilin identifiziert (Giesemann et al., 1999). Es wird für SMN eine Beteiligung am RNA-Metabolismus vermutet und die Koloalisation von Profilin mit „small nuclear ribonucleoprotein particle (snRNP)-core proteins“ deutet ebenfalls auf eine Beteiligung Profilins am RNA-Processing hin (Skare et al., 2003). Weitere Cytoskelett-Proteine, wie Aktin oder Ezrin lokalisieren im Kern, wobei die genaue Funktion dieser Proteine im Zellkern noch nicht geklärt ist (Clark and Rosenbaum, 1979; Gonsior et al., 1999; Jockusch et al., 1974; Kaul et al., 1999).

Es ergibt sich für die Funktion von Profilin in der Zelle eine sehr komplexes Bild. Profilin ist für den Organismus bzw. auch für die einzelne Zelle essentiell. Die Rolle Profilins ist eindeutig mit der Organisation des Aktin-Cytoskeletts in der Zelle verknüpft, wobei die Interaktion mit Aktin *in vitro* wie auch *in vivo* eine große Bedeutung hat. Die Wechselwirkung mit PIP₂ und zahlreichen Poly-Prolin-Liganden impliziert darüber hinaus auch regulierende Einflüsse von Profilin auf das Aktin-Cytoskelett. Im folgenden Kapitel wird auf die Rolle von Profilin als Tumorsuppressor eingegangen, die erst vor kurzem belegt werden konnte.

3. Profilin als Tumorsuppressor-Protein

Die Transformation von Zellen in Gewebekulturen führt in vielen Fällen zum Verlust der Kontaktinhibition, zu Veränderungen im Serum- und adhäsionsabhängigen Zellwachstum, in der Motilität, in der Morphologie und in der Organisation des Aktin-Cytoskeletts. Der geringere Organisationsgrad des Mikrofilamentsystems und der Verlust von Fokalkontakten sind allgemeine Charakteristika eines transformierten, tumorigenen Phänotyps. Der geringere Organisationsgrad des Mikrofilamentsystems korreliert mit veränderter Expression einer

Vielzahl von Cytoskelett-Proteinen (Button et al., 1995; Pawlak and Helfman, 2001). Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass Cytoskelett-Proteine, wie Tropomyosin (Matsumura et al., 1983), Caldesmon (Owada et al., 1984), Transgelin (Shapland et al., 1988), α -Actinin (Gluck et al., 1993), Gelsolin (Vandekerckhove et al., 1990) und Vinculin (Rodriguez Fernandez et al., 1992) in transformierten Zellen oder in Tumorgeweben reduziert exprimiert werden. Die Anhebung des Proteinspiegels dieser Proteine durch Transfektion führte in allen Fällen zur Suppression des tumorigenen Phänotyps. Folglich handelt es sich bei diesen Proteinen um Tumorsuppressor-Proteine.

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. S. Scherneck konnte von uns gezeigt werden, dass humanes Profilin I eine Tumorsuppressor-Aktivität in Brustkrebszellen besitzt (Janke et al., 2000). Vorausgegangen war diesem Ergebnis der Transfer des humanen Chromosoms 17 in die Brustkrebszelllinie CAL51 mit daraus resultierender Suppression der Tumorigenizität in den generierten CAL51 Zellklonen CAL17.5 und CAL17.1 (Theile et al., 1995). Die Brustkrebszelllinie CAL51 wurde 1984 am Cancer Center Antoine-Lacassagne (CAL) in Frankreich aus einem invasivem Adenokarzinom in Kultur genommen und zeigt kurze Generationszeiten, verankerungsunabhängiges Wachstum in Weichagar und Tumorigenizität in Nacktmäusen (Gioanni et al., 1990). Darüber hinaus besitzt sie einen stabilen Karyotyp und aufgrund der Morphologie und immunologischen Nachweisen einen noch epitheloiden Charakter. Auf Chromosom 17 liegen mehrere Tumorsuppressor-Gene, wie etwa p53 (Bereich:17p13.1) und BRCA1 (Bereich: 17q12-21), die früher schon charakterisiert wurden und es werden dort weitere Kandidatengene vermutet. Bei dem Transfer des Chromosoms in CAL51 wurde nicht das vollständige Chromosom übertragen, sondern nur der chromosomale Bereich 17p13.3 (Theile et al., 1995). Der Vergleich der mRNA-Profile von CAL51 mit CAL17.5 Zellen ergab, dass die Transkription des Profilin I-Gens in CAL51 stark reduziert ist (Janke et al., 2000). Weitere Untersuchungen führten zu dem Ergebnis, dass die Profilin I Expression in mehreren Brustkrebszelllinien und in Tumorgewebe signifikant reduziert ist, im Vergleich zu Brustepithelzelllinien und normalem Brustdrüsengewebe. Die Restauration des Profilinspiegels durch Transfektion der Profilin I-cDNA in CAL51 resultierte in Zellklonen mit reduzierten Generationszeiten, verankerungsabhängigem Wachstum in Weichagar und supprimierter Tumorigenizität in Nacktmäusen. Darüber hinaus zeigten diese Zellklone ein besseres Absetzverhalten als CAL51 Zellen und das Aktin-Cytoskelett ist in diesen Zellklonen besser organisiert als in der Krebszelllinie. Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Anhebung des Profilinspiegels in dieser Krebszelllinie die Tumorigenizität supprimiert.

Häufige Ursachen für reduzierte Proteinexpressionen bei Tumorsuppressor-Proteinen sind Deletionen oder Mutationen im codierenden Bereich des Gens oder die Hypermethylierung des Promotors. Deletionen oder Mutationen verhindern eine Expression des Proteins oder führen zur Translation von nicht-funktionellen Polypeptiden. Da im Profilingen keine Mutationen oder Deletionen gefunden wurden (Janke et al., 2000), wird der Profilingenspiegel durch diese Mechanismen in der Krebszelllinie nicht reduziert. Daraufhin wurde der Methylierungsstatus der Promotorregion des Profilingens analysiert. Genomische DNA ist bei Eukaryonten bis zu einem gewissen Grad methyliert, was vermutlich der Transkriptionskontrolle dient. In vielen Fällen hat man Korrelationen zwischen dem Zustand der DNA-Methylierung und der Gen-Expression finden können (Siegfried et al., 1999). Die starke Methylierung von Promotorregionen bestimmter Gene resultiert in einer Bindungshemmung von RNA-Polymerasen oder Transkriptionsfaktoren, so dass es zur reduzierten Transkription des Gens kommt (Leung et al., 2003). Dies ist häufig bei Tumorsuppressor-Proteinen der Fall (Chen et al., 2003). Es gibt für das Profilin I-Gen drei mögliche Promotorregionen im 5'-untranslatiertem Bereich. Die Analyse dieser Promotorregionen in Tumorgewebe und Brustkrebszelllinien hat ergeben, dass keine Hypermethylierungen auftreten (Jandrig et al., persönliche Mitteilung). Folglich ist eine Hypermethylierung des Profilinpromotors nicht die Ursache für reduzierte Profilinexpressionen in Brustkrebszellen.

4. Zielsetzung

Für das Bestehen eines Organismus ist Profilin essentiell, da der Verlust oder reduzierte Profilinexpressionen zum Tod des Organismus oder zur Entartung von Zellen führen. Es ist nicht geklärt, welche Mechanismen zu einer reduzierten Profilinexpression in Brustkrebszellen und Tumorgeweben führen. Die Restauration des Profilinspiegels in CAL51 Zellen mit funktionellem Profilin I führte zur vollständigen Suppression der Tumorigenizität in der Nacktmaus (Janke et al., 2000). Ob der Einfluss von Profilin auf die Aktinpolymerisation oder die PIP₂-abhängige Aktivierung der Aktinpolymerisation durch Profilin eine tragende Rolle in der Tumorsuppression spielen, ist zur Zeit nicht geklärt. Des Weiteren ist offen, ob die Rekrutierung von Profilin in Bereiche hoher Aktindynamik durch Poly-Prolin-Liganden für die Tumorsuppression notwendig ist.

Das Ziel dieser Arbeit war, die Funktion von Profilin bei der Tumorsuppression, im Speziellen die Interaktion mit verschiedenen Liganden und somit den regulierenden Einfluss von Profilin auf bestimmte Signalwege in der Zelle näher zu untersuchen. Dafür sollte die Brustkrebszelllinie CAL51 mit Profilinmutanten, die jeweils in ihrer Interaktion mit G-Aktin, Poly-Prolin-Liganden oder Phospholipiden gestört sind, stabil transfiziert werden. Die generierten Zellklone sollten in Bezug auf die Expression der mutierten Profile analysiert und ihre tumorigenen Eigenschaften charakterisiert werden. Für die Charakterisierung des tumorigenen Phänotyps sollte die Proliferationsrate und das „Spreading“-Verhalten bestimmt werden, die Substratabhängigkeit der Proliferation und der Differenzierungsgrad im Matrigel analysiert, sowie die Tumorigenizität in der Nacktmaus untersucht werden.

II. Material und Methoden

1. Material

1.1 Geräte

- Kühlzentrifuge J2-MC, Beckman (München)
- UV-VIS Spectrophotometer UV-1202, Shimadzu (Duisburg)
- Fluoreszenz-Mikroskop Axiophot, Zeiss (Jena)
- Ultraschallgerät B-12, Branson (Danbury, USA)
- UV-Leuchttisch und UV-Bilddokumentation E.A.S.Y. 429K, Herolab GmbH (Wiesloch)
- Konfokales Mikroskop (GBF, Braunschweig)
- ABI-Prism 310 Genetic Analyzer System (Perkin Elmer Applied Biosystems, Weiterstadt)

1.1 Chemikalien und Enzyme

Alle verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Boehringer (Mannheim), Fluka (Neu-Ulm), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Difco (Hamburg), Applichem (Darmstadt) und Merck (Darmstadt) bezogen.

Die Enzyme stammen von den Firmen GIBCO BRL Life Technologies (Eggenstein), MBI Fermentas (St-Leon-Rot) und New England Biolabs (Schwalbach).

1.2 Medien und Lösungen

Die Anzucht von *Escherichia coli* erfolgte in LB-Medium:

LB-Medium: 10g NaCl

10g Trypton

5g Hefeextrakt

mit H₂O auf 1000 ml auffüllen und mit NaOH pH 7,5 einstellen

LB-Agar-Platten: 1,5% (w/v) Agar dem LB-Medium zusetzen

Die Expression von rekombinanten Proteinen in *E. coli*-Kulturen erfolgte in zweifach konzentriertem YT-Medium:

2x YT-Medium: 10g NaCl

10g Hefeextrakt

16g Trypton

mit H₂O auf 1000 ml auffüllen und mit NaOH pH 7,5 einstellen

Die Selektion der rekombinanten Klone erfolgte durch Zugabe von 150 µg/ml Ampicillin oder 30 µg/ml Kanamycin in die Medien, je nach verwendetem Plasmid.

Die Zelllinie CAL51 und deren Derivate wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (PAA Laboratories, Cölbe) mit Zusatz von 10% fötalem Kälberserum (PAA Laboratories, Cölbe) kultiviert.

Die Zelllinie MCF-10A wurde in DMEM + HAM'S F-12 Medium 1:1 (PAA Laboratories, Cölbe) mit folgenden Zusätzen kultiviert:

5% Horse Serum (PAA Laboratories, Cölbe)

20ng/ml Epidermal Growth Factor (Biochrom AG, Berlin)

0,01mg/ml Insulin (Gibco BRL, Eggenstein)

500ng/ml Hydrocortison (Biochrom AG, Berlin)

Häufig genutzte Lösungen waren PBS (137 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM NaH₂PO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, pH 7,3) und Trypsin-EDTA-Lösung in PBS (PAA Laboratories, Cölbe).

1.4 Bakterienstämme

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende *Escherichia coli*-Stämme eingesetzt:

BL 21(DE3)pLysS: F⁻dcm ompT hsdS(r_B-m_B-)gal Lambda(DE3) [pLysS Cam^r]

XL1 blue : supE44 hdsR17 recA1 endA1 gyrA46thi relA1 lac⁻ F['][proAB⁺ lacI^qlacZ M15 Tn10(tet)]

Für die Anzucht von *E. coli* wurden 2 bis 10 ml LB-Medium mit Einzelkolonien beimpft und über Nacht im Rundschüttler (220 rpm) bei 37°C inkubiert. Größere Kulturen wurden im Verhältnis 1:50 bis 1:100 mit Über-Nacht-Kulturen angeimpft und im Schüttelinkubator bei 220 rpm und 37°C bis zur gewünschten optischen Dichte angezogen. LB-Agar-Platten

wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Selektion erfolgte durch Zugabe von Antibiotika in das Medium (siehe II.1.3).

1.5 Vektoren

Mittels PCR wurde die Profilin I-cDNA als 5' *EcoRI*/3' *XhoI*-Fragment amplifiziert und in einen modifizierten pcDNA3-Vektor kloniert (pcDNA-BiPro). Dieser Vektor trägt in seiner „multiple cloning site“ vor der *EcoRI*-Schnittstelle eine DNA-Sequenz, die für das Epitop des Birkenprofilin (BiPro) Antikörpers 4A6 kodiert (Rudiger et al., 1997). Die drei in dieser Arbeit benutzten Mutanten des humanen Profilin I, hPFNI/Y59A, hPFNI/H133S und hPFNI/R88L, wurden mir von Dr. Kathrin Schlüter freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Mit diesen cDNAs wurde wie mit der Profilin I-cDNA verfahren.

Für die Expression von rekombinantem BiPro-markierten Profilin I in Bakterien wurde in den pET21c+-Vektor (Novagen, Madison) die DNA-Sequenz für das BiPro-Epitop tag über die Schnittstellen *NdeI*/*BamHI* kloniert. Anschließend wurde die mittels PCR als 5' *EcoRI*/3' *XhoI*-Fragment amplifizierte Profilin I-cDNA inseriert.

Alle rekombinanten Konstrukte wurden sequenziert, amplifiziert und dann für die Expression in CAL51- bzw. *E.coli* Zellen verwendet.

1.6 Oligodesoxynukleotide

Zur Amplifikation und Sequenzierung spezifischer DNA-Fragmente wurden die in Tab. II.1 aufgelisteten, synthetischen Oligodesoxynucleotide verwendet (MWG Biotech, Ebersberg).

Tab. II.1 Oligodesoxynucleotide

Bezeichnung	Sequenz 5'>3'
Prof Eco	TGA ATT CAT GGC CGG GTG GAA C
Prof Xho	TCT CGA GTC AGT ACT GGG AAC G
neof	ACT GGG CAC AAC AGA CAA TC
neor	GCC ATT TTC CAC CAT GAT AT
BiproNde	TAT GTC CTT CCC ACA GTT TAA GCC TCA GGA AAT CG
BiproBam	GAT CCG ATT TCC TGA GGC TTA AAC TGT GGG AAG GAC

1.7 Antikörper

Für die Identifizierung bestimmter Proteine im Immunblot und in der Immunfluoreszenz wurden die in Tabelle II.2 und II.3 aufgelisteten Antikörper verwendet.

Tab. II.2 Erstantikörper

Name	Spezifität	Spezies	Verdünnung
2H11 (Mayboroda et al., 1997)	anti-Profilin I	Maus	1:2 in IF 1:10 im Blot
a-Bipro 4A6 (Wiedemann et al., 1997)	anti-Birken-Profilin	Maus	1:3 in IF 1:5 im Blot
2G2 (Gonsior et al., 1999)	anti-Aktin	Maus	1:400 im Blot
a-αTubulin (Sigma-Aldrich)	anti-Tubulin	Maus	1:1500 im Blot

Tab. II.3 Zweitantikörper

Name	Spezifität	Spezies	Verdünnung
a-Maus IgG HRP (Sigma-Aldrich)	anti-Immunglobulin aus Maus, Peroxydase- gekoppelt	Kanninchen	1:3000 im Blot
a-Maus IgG TRITC (Sigma-Aldrich)	anti-Immunglobulin aus Maus, TRITC- gekoppelt	Kanninchen	1:200 in IF
a-Maus IgG Alexa (MoBiTec)	anti-Immunglobulin aus Maus, Alexa Fluor 568- gekoppelt	Ziege	1:300 in IF

IF: Immunfluoreszenz, Blot: Immunblot, TRITC: Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat

1.8 Zelllinien

Folgende Zelllinien wurden in dieser Arbeit verwendet :

CAL51 : (Gioanni et al., 1990) humane Brustkrebszelllinie

MCF-10A: (Soule et al., 1990) humane nicht transformierte Epithelzelllinie, beide Zelllinien wurden freundlicherweise von Prof. Dr. S. Scherneck, Max-Delbrück-Centrum für molekulare Medizin, Berlin zur Verfügung gestellt

2. Methoden

2.1 Mikrobiologische Methoden

2.1.1 Anzucht von Bakterien

Für die Anzucht von *E.coli* wurden 2 bis 10 ml LB-Medium mit Einzelkolonien beimpft und ü.N. im Rundschüttler (220 rpm) bei 37°C inkubiert. Größere Kulturen wurden im Verhältnis 1:50 bis 1:100 mit ü.N. Kulturen angeimpft und im Schüttelinkubator bei 220 rpm und 37°C zur gewünschten optischen Dichte angezogen. LB-Agar-Platten wurden ü.N. bei 37°C inkubiert. Die Selektion erfolgte durch Zugabe von Antibiotika in das Medium.

2.1.2 Dauerkultivierung von Bakterien

Die ü.N. Kulturen wurden im Verhältnis 1:5 mit Glycerin versetzt und anschließend bei -80°C über längere Zeiträume gelagert.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Herstellung kompetenter Bakterien für die Transformation

Damit Bakterien nackte Fremd-DNA aufnehmen können, muss ihre Zellwand verändert werden. Durch folgende Methode können Bakterien „kompetent“ gemacht werden.

100 ml einer Bakterien-Kultur wurden in LB-Medium bei 37°C bis zu einer OD (600 nm) von 0,5 angezogen und anschließend 5 min auf Eis gekühlt. Nach Zentrifugation der Bakteriensuspension bei 5000 rpm und 4°C für 10 min wurde das Bakteriensediment in 100 ml TFB I resuspendiert und anschließend für 10 min auf Eis gestellt. Nach weiterer Zentrifugation bei 5000 rpm und 4°C für 10 min wurde das Sediment in 5 ml TFB II aufgenommen und sofort zu 200 µl aliquotiert, welche in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert wurden.

TFB I: 300 mM NaHCO₃ pH 5,8

10 mM CaCl₂

100 mM NaCl

50 mM MnCl₂

15 %(v/v) Glycerin

TFB II: 10 mM MOPS pH 7,0

75 mM CaCl₂

10 mM NaCl

15 %(v/v) Glycerin

2.2.2 Transformation kompetenter Bakterien

Kompetente Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und 50 µl der Bakterien mit 5 µl Ligationsansatz oder 0,1 bis 0,5 µg Plasmid-DNA versetzt. Dieser Ansatz inkubierte 30 min auf Eis. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 30 s, um die Effizienz der DNA-Aufnahme zu erhöhen. Nach Abkühlung auf Eis (1 min) wurde der Ansatz mit 200 µl LB-Medium versetzt und unter leichtem Schütteln bei 37°C inkubiert. Die Inkubation erfolgte ohne Antibiotika, da die für die Resistenz erforderlichen Proteine erst exprimiert werden mussten. Zur Selektion der transformierten Bakterien-Klone wurde der Transformationsansatz auf antibiotikahaltige LB-Agar-Platten ausplattiert und ü.N. bei 37°C inkubiert.

2.2.3 Minipräparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Für die Klonanalyse rekombinanter Bakterien wurden 2 ml LB-Medium mit Einzelkolonien beimpft und ü.N. bei 37° C angezogen. 1,5 ml dieser Kultur wurden bei 6000 rpm und Raumtemperatur für 5 min zentrifugiert. Das Sediment in 0,4 ml Puffer P1 (Puffer P1, P2 und P3 siehe Angaben im „Qiagen Plasmid Purification Handbook“) resuspendiert, 0,4 ml P2 zugegeben, geschwenkt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Neutralisation der Lysisreaktion erfolgte durch Zugabe von 0,4 ml P3 und Inkubation für 5 min auf Eis. Genomische DNA und Zellbestandteile wurden durch zweimaliges Zentrifugieren bei 13000 rpm für jeweils 10 min entfernt und die im Überstand enthaltene Plasmid-DNA gefällt. Das durch Zugabe von 0,8 ml Isopropanol und Zentrifugation bei 13000 rpm für 30 min erhaltene Pellet wurde anschließend mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 35 µl H₂O resuspendiert.

2.2.4 „Midi“ Plasmid-Präparation

Plasmid-„Midi“-Präparationen wurden nach Herstellerprotokoll (Plasmid Midi Protokoll) mit dem „Qiagen Plasmid Purification Kit“ (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Die isolierte Plasmid-DNA wurde in 200 µl H₂O aufgenommen (Schritt 11 im Protokoll).

2.2.5 Präparation genomischer DNA aus eukaryontischen Zellen

Die kultivierten Zellen wurden mit PBS gewaschen, abtrypsiniert und sedimentiert. Das Zellsediment wurde in 500 µl STE-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 8, 100 mM EDTA, 0,5 % SDS, 20 µg/ml RNaseA) resuspendiert, anschließend 75 µl Proteinase K (20 mg/ml) zugegeben und ü.N. bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden 2 ml Phenol zugegeben, gemischt und 40 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze in ein neues Gefäß überführt. Der abgenommene Überstand wurde mit 2 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25:24:1 versetzt, 10 min rotiert und bei 3000 rpm für 10 min zentrifugiert. Abermals wurde der Überstand abgenommen, mit 2 ml Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt, gemischt und wie oben beschrieben zentrifugiert. Schließlich wurde der Überstand in ein neues Gefäß

überführt, 4,4 ml 96%iger Ethanol und 200 µl 3 M NaOAc zugegeben, gemischt und die präzipitierte DNA entnommen. Die DNA wurde einmal mit 70%igem Ethanol gewaschen, kurz getrocknet und in 150 µl H₂O ü.N. gelöst.

2.2.6 DNA-Konzentrationsbestimmung

Um die Konzentration von DNA in wässriger Lösung zu bestimmen, wird die Absorption der DNA bei 260 nm gemessen. Bei doppelsträngiger DNA entspricht eine Absorption von 1 einer Konzentration von 50 µg/ml DNA, bei einzelsträngiger DNA und RNA 40 µg/ml.

Die Reinheit von Nukleinsäuren wird durch das Verhältnis der Absorption bei 260 nm zu 280 nm bestimmt. Bei einer Wellenlänge von 280 nm absorbieren die aromatischen Aminosäuren von Proteinen. Der Quotient OD₂₆₀ / OD₂₈₀ sollte bei 1,8 bis 2,0 liegen.

2.2.7 Analytischer und präparativer Restriktionsverdau von DNA

Desoxyribonucleasen, oder kurz DNasen, sind Enzyme, die spezifische DNA-Sequenzen erkennen und innerhalb dieser Sequenz die DNA durch Spaltung von zwei Phosphodiesterbindungen schneiden. Je nach verwendetem Enzym entstehen dabei DNA-Fragmente mit einzelsträngigen, überhängenden („sticky ends“) oder doppelsträngigen, glatten („blunt ends“) Enden. Mit Restriktionsenzymen kann man DNA-Moleküle in Fragmente zerlegen, die durch Agarosegelelektrophorese analysiert werden können (siehe II.2.2.9).

Für analytische Zwecke wurden 0,5 bis 2 µg DNA, für präparative Anwendungen 1 bis 5 µg DNA in einem Reaktionsvolumen von 10 bis 50 µl und 0,5 bis 1 Enzymeinheit pro 1 µg DNA eingesetzt. Die Reaktionsbedingungen, wie Reaktionspuffer und Inkubationszeiten wurden den Herstellerempfehlungen nach entsprechend ausgewählt. Mussten bei einer Anwendung mehrere Enzyme verwendet werden, so geschah die Inkubation nacheinander, wobei die Pufferbedingungen für das zweite Enzym nachträglich eingestellt wurden. Die Reaktion wurde wenn möglich durch Hitzeinaktivierung gestoppt.

2.2.8 Ligation

DNA-Ligasen katalysieren die Bildung einer Phosphodiester-Bindung zwischen einer 5'-Phosphatgruppe an einem DNA-Ende und der 3'-Hydroxyl-Gruppe an dem anderen DNA-Ende. Mit Hilfe dieser Enzyme ist die Insertion von Fremd-DNA in Vektoren möglich.

Für die Ligationen wurde die T4-DNA-Ligase der Firma MBI Fermentas und die mitgelieferten Puffer verwendet. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Ligationen wurden in einem Gesamtvolumen von 10 µl mit 500 ng Insert-DNA, 100 ng Vektor-DNA, 1 µl 10x T4-DNA-Ligase-Puffer, 5 U T4-Ligase über Nacht bei 14° C durchgeführt.

Anschließend wurde die neukombinierte DNA für die Transformation von *E. coli* verwendet.

2.2.9 Agarosegelelektrophorese

Nukleinsäuren, die aufgrund ihres Zucker-Phosphat-Gerüsts stark negativ geladen sind, können im elektrischen Feld mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese ihrem Molekulargewicht nach aufgetrennt werden. Hierbei ist die Mobilität eines DNA-Fragmentes proportional zum Logarithmus seiner Molmasse.

Weiter hängt die Mobilität eines DNA-Fragmentes von der Agarosekonzentration im Gel ab. Um die DNA-Fragmente im Gel sichtbar zu machen, wird der Farbstoff Ethidiumbromid zugegeben, der nach Interkalation in die DNA-Doppelhelix unter UV-Licht fluoresziert. Die Größe der Banden kann durch den Vergleich mit einem DNA-Marker festgestellt werden.

Für die Agarosegelelektrophorese wurde das TAE-Puffersystem (20 x TAE: 96,8 g Tris, 40 ml 0,5 M EDTA, pH 8, 22,84 ml Eisessig, pH 8,3 einstellen und auf 1 L mit H₂O auffüllen) verwendet. Die Proben wurden vorher 1:5 mit Gelladepuffer (je 0,1% (w/v) Bromphenolblau und Xylencyanol, 30 % (v/v) Glycerin in 5fach konzentriertem TAE-Puffer) versetzt und es wurde ein DNA-Marker aufgetragen. Als Marker diente der „Gene Ruler DNA Ladder Mix“ von MBI Fermentas. Anschließend wurden die Gele im UV-Bilddokumentationssystem dokumentiert.

2.2.10 DNA-Fragmentisolierung

Die DNA-Fragmentisolierung wurde mit dem „Qia Ex Gel Extraktion Kit“ der Firma Qiagen entsprechend der Herstelleranleitung durchgeführt. Die Effizienz der Fragmentisolierung wurde mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese überprüft.

2.2.11 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung doppelsträngiger DNA wurde mit dem ABI-Prism 310 Genetic Analyzer System (Perkin Elmer Applied Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt, welches auf dem Prinzip der Didesoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger beruht (Sanger et al., 1977).

Die Sequenzierungs-PCR wurde mit einem „Big Dye Terminatoren Mix“ durchgeführt, der neben Puffern und DNA-Polymerase, unterschiedlich fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide enthielt. Die markierten DNA-Fragmente wurden vom Gerät während der Elektrophorese mittels Laser angeregt und gemessen. Die Auswertung erfolgte über die zugehörigen Computerprogramme.

Für die Sequenzierungs-PCR wurden 2 µl „Big Dye Terminatoren Mix Version“, 5 pmol Primer und 0,7 µg DNA zusammengegeben und mit H₂O auf 10 µl eingestellt. Der jeweilige Primer bestimmt die „Annealing“-Temperatur der PCR-Reaktion und die weiteren Parameter des PCR-Programms wurden entsprechend den Herstellerangaben (Perkin Elmer) gewählt.

Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von 10 µl H₂O, 2 µl 3 M NaAc pH 4,6 und 55 µl 100% Ethanol und Zentrifugation bei 13000 rpm für 30 min gefällt. Das Pellet wurde einmal mit 250 µl 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 12,5 µl „Template Suppression Reagent“ aufgenommen. Nach Denaturierung für 2 min bei 95°C konnte die Probe in Sequenziergefäße überführt und sequenziert werden.

2.3 Biochemische Methoden

2.3.1 Expression und Reinigung von rekombinantem Profilin

Für die Reinigung von Profilin nutzt man die Interaktion von Profilin mit Poly-L-Prolin (Tanaka and Shibata, 1985). Die rekombinanten Profiline wurden mittels einer Poly-L-Prolin-Sepharose-Säule gereinigt und mit Harnstoff eluiert. Die Renaturierung des Profilins nach der Elution von der Säule erfolgte durch schrittweises Umpuffern mittels Dialyse. Das Säulenmaterial, Cyanbromid-aktivierte Sepharose CL-4B (Pharmacia) an die kovalent Poly-L-Prolin (Sigma) gekoppelt wurde, wurde mir freundlicherweise von Dr. K. Schlüter zur Verfügung gestellt.

Für die Expression wurden die entsprechend transformierten Kulturen in je 1,5 L YT-Medium mit den jeweiligen Antibiotika als Selektionsmarker bis zu einer OD bei 600 nm von 0,5 im Schüttelinkubator bei 37° C und 220 rpm angezogen. Durch Zugabe von 1 mM IPTG (Endkonzentration) wurde die Expression induziert und für 4 h fortgeführt. Anschließend wurde die Bakteriensuspension bei 6000 rpm für 15 min und 4°C zentrifugiert und das Sediment in 100 ml kaltem Lysispuffer aufgenommen. Durch Ultraschall-Behandlung (10 x 30 s 80W mit je 30 s Pause im Eiswasserbad) und Inkubation mit 15 mg Lysozym für 20 min bei Raumtemperatur wurden die Bakterien aufgeschlossen. Größere Zellbestandteile sedimentierten durch Zentrifugation für 50 min bei 14000 rpm und 4°C und der Überstand wurde auf eine Poly-L-Prolin-Sepharose-Säule mit einer Fließgeschwindigkeit von 40 ml/h aufgetragen. Im Anschluss wurde die Säule mit Waschpuffer mit einer Fließgeschwindigkeit von 50 ml/h gewaschen, bis die Überprüfung der Fraktionen durch Messung der OD bei 280 nm ergab, dass kein Protein mehr herunter gewaschen wurde (OD 280 nm = 0,01). Unspezifisch gebundene Proteine wurden mit 2 M Harnstoff in Waschpuffer von der Säule entfernt und die Elution des gebundenen Profilins erfolgte mit 6 M Harnstoff mit einer Fließgeschwindigkeit von 40 ml/h. Das Eluat wurde fraktioniert und die Protein-haltigen Fraktionen über die OD ermittelt. Mittels einer SDS-PAGE wurden die Eluatfraktionen analysiert und die Profilin-haltigen Fraktionen vereinigt. Die Suspension wurde anschließend über 40 h und in fünf Schritten mit abnehmender Harnstoff- und DTE-Konzentration dialysiert. Es wurden je nach Protein Dialyseschläuche (Spectrum Medical Industries, California) mit einem MWCO („molecular weight cut off“) von 8000 oder 14000 Dalton

benutzt. Die Profile wurden nach Konzentrierung und Konzentrationsbestimmung 1:2 mit Glycerin versetzt und bei -20°C gelagert.

Lysispuffer: 50 mM Tris-HCl

10 mM EDTA

10 mM NaCl

1,5% (v/v) Triton X-100

1:1000 Trasylol (Bayer)

50 μM Pefabloc SC

1 μM Pepstatin A

pH 7,5

10 x Waschpuffer: 200 mM Tris-HCl

1,5 M NaCl

pH 7,6

10 x Dialysepuffer: 100 mM Tris-HCl

2 mM CaCl_2

Dialysepuffer I: 2 M Urea

2,5 mM DTE

mit 1x Dialysepuffer auf 500 ml auffüllen und pH 7,6 einstellen

Dialysepuffer II: 2,5 mM DTE

mit 1x Dialysepuffer auf 500 ml auffüllen und pH 7,6 einstellen

Dialysepuffer III: 1,25 mM DTE

mit 1x Dialysepuffer auf 500 ml auffüllen und pH 7,6 einstellen

Dialysepuffer IV+V: 1,25 mM DTE

mit 1x Dialysepuffer auf 1000 ml auffüllen und pH 7,6 einstellen

Die gereinigten Proteine wurden mit den folgenden beiden Methoden konzentriert:

1. Druckfiltration mit einer Amicon-Rührzelle (Amicon (Witte))

Es wurden YM3- und YM10-Membranen verwendet und unter 3,7 atm Stickstoff die Druckfiltration ausgeführt.

2. Zentrifugation durch eine semipermeable Membran

Es wurden Amicon-Centricon-Röhrchen (Amicon) mit einem MWCO von 5 oder 10 kDa benutzt und mit 3000 rpm zentrifugiert.

Abbildung 7 zeigt die Elutionsprofile der Reinigung von humanem Profilin I und BiPro-markiertem Profilin I. Die Elution erfolgte in zwei Schritten, wobei der erste Schritt (mit 2 M Harnstoff) der Entfernung unspezifisch gebundener Proteine diente. Anschließend wurde Profilin durch Denaturierung mit 6 M Harnstoff von der Säule eluiert. Die Renaturierung des Proteins erfolgte durch mehrere Dialyseschritte.

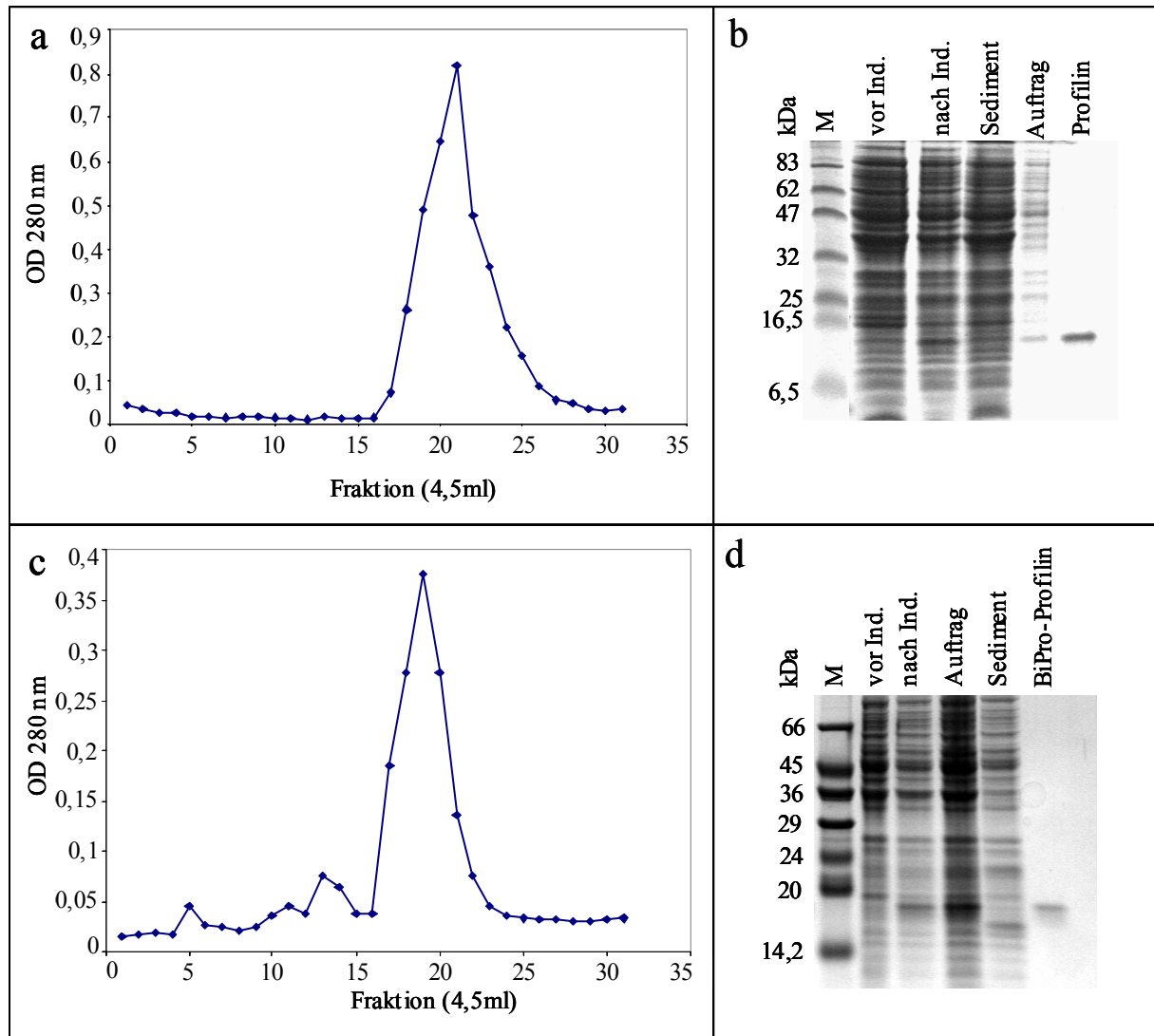


Abb.7: Aufreinigung von humanem Profilin I und BiPro-markiertem Profilin I

Elutionsprofile von Profilin I (a) und BiPro-markiertem Profilin I (c) mit 2 M Harnstoff (Fraktion 1 bis 10) und 6 M Harnstoff (Fraktion 11 bis 31). Die Fraktionen wurden photometrisch bei 280 nm vermessen, um zu identifizieren in welchen Fraktionen Protein enthalten ist. (b + d) Elektrophoretische Dokumentation der Aufreinigungen: Proteingrößen in kDa, Marker in b: „Prestained Protein Marker“, Marker in d: „Low Molecular Weight Marker“, Bakterienextrakt vor Induktion, Bakterienextrakt nach Induktion, Sediment nach Aufschluss der Bakterien, Auftrag auf die Säule, Elutionsfraktion.

Die Reinheit der gewonnenen Proteine ist aufgrund der stringenten Waschbedingungen hoch (siehe Abb.7 b+d). Die Protein-Ausbeuten der Aufreinigungen sind unterschiedlich: aus 1,5 L

Expressionskultur konnten ca. 0,6 mg BiPro-markiertes Profilin I und ca. 3 mg Profilin I gewonnen werden.

Die gereinigten rekombinanten Profileine wurden für die Standard-Eichgeraden in den quantitativen Immunblots verwendet.

2.3.2 Proteinbestimmung nach Bradford (1976)

Die Bestimmung der Proteinkonzentration einer Lösung wurde anhand einer Rinderserumalbumin-Eichgerade durchgeführt. Der lineare Bereich liegt bei dieser Methode bei 1 bis 10 µg Protein pro Ansatz. 100 µl Probe wurden mit 1 ml Bradford-Reagenz versetzt, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend photometrisch bei 595 nm vermessen (Bradford, 1976).

2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden Proteine unter denaturierenden Bedingungen ihrem Molekulargewicht entsprechend in einem Trägermaterial aufgetrennt. Die elektrophoretische Beweglichkeit der Proteine ist dem Logarithmus ihrer Masse proportional. SDS ist ein Detergenz, welches alle nicht-kovalenten Wechselwirkungen in nativen Proteinen zerstört und zusätzlich stark negativ geladen ist und so die Eigenladung der Proteine überlagert, so dass alle Proteine der Masse nach aufgetrennt werden. Es wurde ein diskontinuierliches Gelsystem, mit einem Sammelgel und einem Trenngel, die sich in pH-Wert und Acrylamidkonzentration unterscheiden, verwendet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden nur 13%-ige Tricin-SDS-Gele nach Schägger & v. Jagow (1987), welche eine Auftrennung in niedermolekularen Bereichen gewährleisten, verwendet. Die Proteinproben wurden vor dem Auftrag auf das Gel mit Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C aufgeköcht. Die Auftrennung erfolgte bei 80 bis 120 V. Die Proteinbanden wurden anschließend durch Anfärben mit Coomassie-Blau-Lösung dargestellt oder das Gel für einen Immunblot in Transferpuffer inkubiert. Zur Bestimmung der Molekulargewichte der aufgetrennten Proteine wurde der „Low Molecular Weight Marker“ (LMW) von Sigma oder der „Prestained Protein Marker“ (NEB) ebenfalls auf das Gel aufgetragen.

Anodenpuffer: 0,2 M Tris-HCl pH 8,9

Kathodenpuffer: 0,1 M Tris-HCl pH 8,25

0,1 M Trizin

0,1 % (w/v) SDS

Trizingelpuffer: 3 M Tris-HCl pH 8,45

0,3 % (w/v) SDS

Acrylamid-Stammlösung: 48 % (w/v) Acrylamid

1,5 % (w/v) Bisacrylamid

5 x Probenpuffer: 167 mM Tris-HCl pH 8,8

4,2 mM EDTA

830 mM Saccharose

3,3 % (w/v) SDS

8 mM DTE

Bromphenolblau

Zusammensetzung des 13%-igen Trenngels: 13,3 ml Trizingelpuffer

5,3 g Glycerin

10,7 ml Acrylamid-Stammlösung

10,7 ml H₂O dest

200 µl 10% (w/v) APS in H₂O

20 µl TEMED

Zusammensetzung des Sammelgels:

3 ml Trizingelpuffer

1 ml Acrylamid-Stammlösung

6 ml H₂O dest

100 µl 10% (w/v) APS in H₂O

10 µl TEMED

Coomassie-Lösung: 15 % (v/v) Isopropanol

10 % (v/v) Eisessig

0,025 % (w/v) Coomassie blau

Entfärb-Lösung: 12,5 % (v/v) Isopropanol

10 % (v/v) Eisessig

2.3.4 Spezifischer Nachweis von Proteinen im Immunblot

Mit dieser Methode kann man in der SDS-PAGE aufgetrennte Proteingemische auf Trägermembranen transferieren und anschließend mit Hilfe von Antikörpern spezifisch identifizieren. Für einen Immunblot wurden die Proteine in der SDS-PAGE aufgetrennt, das Gel für 10 min in Transferpuffer inkubiert und der Blot in einer Semi-Dry-Blotapparatur wie folgt geschichtet:

Anode – 3 Blatt Whatmanpaper – Nitrocellulose-Membran – Gel – 3 Blatt Whatmanpaper – Kathode

Der Transfer erfolgte bei $2,5 \text{ mA/cm}^2$ für 45 min. Als Trägermaterial wurden Nitrocellulose-Membranen verwendet, an die das Protein gebunden wird. Um den Transfer der Proteine auf die Membran zu überprüfen, wurde das Gel mit Coomassie-Lösung gefärbt und die Membran mit Ponceau-Rot-Lösung angefärbt. Nach dem Entfärben der Membran in basischem Tris-HCl-Puffer wurde sie mit PBS gespült und zur Absättigung freier Bindungskapazitäten mit 5 % (w/v) Milchpulver in PBS für 45 min oder über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die Inkubation mit dem Erstantikörper (Antikörper-Verdünnung mit 1% (w/v) BSA in 1x TBST (0,02 M Tris-HCl, 0,137 M NaCl, 0,1 % (v/v) Tween 20, pH 7,6) erfolgte über Nacht bei 4°C oder für 60 min bei Raumtemperatur. Durch dreimaliges Waschen mit 1x TBST für je 10 min wurde der Antikörper entfernt und die Inkubation mit dem Zweitantikörper (Verdünnung wie oben) für 1 h bei Raumtemperatur konnte folgen. Der Blot wurde einmal 10 min mit 1% TritonX100 in TBST und zweimal je 10 min mit 1x TBST gewaschen.

Die Identifikation der vom Antikörper erkannten Proteine erfolgte über die Umsetzung eines Substrates durch HRP, wodurch ein lumineszierendes Produkt entsteht („enhanced chemiluminescence“ Technik von Amersham, nach Anweisung des Herstellers).

Transferpuffer: 25 mM Tris-HCl pH 8,5

150 mM Glycin

10 % (v/v) Methanol

“Strippen” von Immunblots: Um weitere im Gewebe oder Zellextrakt enthaltene Proteine zu identifizieren, kann man den Blot mit weiteren Antikörpern inkubieren. Man „strippt“ den Immunblot mit einem „Stripping-Buffer“ (0,2 mol/L Na-Acetat, 0,5 mol/L NaCl, pH 2,7), der stark sauer ist und die gebundenen Antikörper lösen kann. Wenn durch mehrmaliges Waschen mit PBS restliche Essigsäure entfernt wurde, wird die Nitrocellulose-Membran erneut abgesättigt, mit Erst- und Zweitantikörpern inkubiert und entwickelt.

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Medien, Kulturgefäße und Kulturbedingungen

Die jeweiligen Zelllinien wurden in den unter 1.3 beschriebenen Medien bei 37°C, 10% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Für die Kultivierung der Zelllinien wurden Kulturgefäße von der Firma Nunc (Wiesbaden-Biebrich) verwendet. Für Immunfluoreszenzen wurden die Zellen auf Deckgläschen ausgesät. Antibiotika wurden den Medien nur im Rahmen von Selektionierungen und der Kultivierung von stabil transfizierten Zellklonen zugesetzt.

2.4.2 Passagieren von Zellen

Adhärente Zellen können durch schonende Behandlung mit Proteasen vom Substrat abgelöst werden, um dann in neue Gefäße ausgesät zu werden. Außerdem werden durch PBS Calcium-Ionen entzogen, wodurch Zell-Zell-Kontakte gelöst werden.

Die Zellen wurden mit sterilem 1x PBS gewaschen, mit Trypsin-EDTA-Lösung inkubiert bis sich ca. 50% der Zellen vom Substrat gelöst hatten. Durch Zugabe von Medium wurde die Enzymwirkung gestoppt, die Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt und in geeigneter Verdünnung in neue Kulturgefäße überführt.

2.4.3 Kryokonservierung von Zellen

Für die Langzeitkonservierung von Zellen wurden ca. 1×10^6 Zellen/ml einen Tag nach dem Passagieren in eiskaltem Einfriermedium (Medium + 20% (v/v) FCS + 10% (v/v) DMSO)

aufgenommen und für 24 h bei -80°C in speziellen Cryo-Röhrchen (Nunc) gelagert. Anschließend wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff für längere Zeiträume gelagert. Nach einigen Tagen wurde die Vitalität der Zellen durch eine Auftaukontrolle überprüft.

2.4.4 Auftauen von kryokonservierten Zellen

Die Cryo-Röhrchen wurden direkt aus dem Stickstofftank in ein 37°C Wasserbad gegeben, bis nur noch wenig Eis im Cryo-Röhrchen zu sehen war. Die Zellen wurden sofort mit 10 ml Medium gemischt und anschließend für 5 min bei 1000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt und die Zellen in neuem Medium in ein Kulturgefäß überführt.

2.4.5 Transfektion von Zellen

2.4.5.1 Transiente Transfektion

Die transiente Transfektion ist ein Verfahren für die Übertragung von DNA in Zellkulturzellen, wobei die DNA nicht stabil ins Genom der Zellen eingebaut wird und im Verlauf weiterer Zellteilungen verloren geht. Die transiente Transfektion ermöglicht es u.a. rekombinante Fusionsproteine oder Epitop-gekoppelte Proteine in Zellen zu exprimieren und deren Lokalisation oder Bindungsverhalten mittels Immunfluoreszenz- und Immunpräzipitationsversuchen zu verifizieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden alle Zelllinien mit dem „FuGENE 6 Transfection Reagent“ (Roche Diagnostics Corporation, Mannheim) transfiziert, was für die transiente wie auch für die stabile Transfektionen gilt. Die Zellen wurden 24 h vor der Transfektion mit einer Zelldichte von 2×10^4 Zellen/ cm^2 ausgesät und 48 h nach der Transfektion für die Immunfluoreszenz fixiert.

2.4.5.2 Stabile Transfektion

Bei der stabilen Transfektion wird die Plasmid-DNA ins Genom der Zelle integriert und während der Mitose an die Tochterzellen weitergegeben. Dieser Vorgang erfolgt bei nur einem kleinen Anteil der Zellen und man selektioniert mit Hilfe eines Antibiotikums, da die Plasmid-DNA einen Selektionsmarker trägt.

Die Zellen wurden mit einer Zelldichte von 2×10^4 Zellen/cm² auf Zellkulturschalen ausgesät und nach 24 h transfiziert. Nach weiteren 24 h wurde mit der Selektion der stabil transfizierten Zellen durch Zugabe von 800 µg/ml Geneticin (Gibco BRL) zum Medium begonnen. Die Geneticinkonzentration, bei welcher die Zelllinie CAL51 nach 5 bis 10 Tagen abstirbt, wurde in einem Vorversuch ermittelt und variiert für jede Zelllinie. Massives Absterben der Zellen trat nach 5 bis 8 Tagen auf und nach weiteren 2 bis 3 Wochen Selektionierung, wobei alle 3 Tage das Geneticin-haltige Medium gewechselt wurde, traten einzeln liegende Zellklone auf. Die Zellklone wurden mit Hilfe von Klonierungszyklindern von der Zellkulturschale genommen und die so erhaltenen Einzelklone vermehrt, eingefroren und charakterisiert.

2.4.6 Herstellung von Zellextrakten

Pro Zelllinie wurden vier 10 cm Zellkulturschalen mit PBS gewaschen, abtrypsinisiert und das Zellpellet je Zellkulturschale in 100 µl Lysispuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 10 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,3% Triton X-100, Pefabloc SC (100 µM), Pepstatin A (1 µM), Leupeptin (10 µM) und Aprotinin (20 U/ml)) resuspendiert. Nach einer Inkubation von 15 bis 30 min auf Eis wurde die Suspension mehrmals in einer kleinen Spritze mit einer feinen Kanüle (26G) geschert. Alle Arbeitgänge wurden auf Eis durchgeführt. Das Zelllysate wurde portioniert bei -80°C eingefroren. Die Zelllysate, die weiter bearbeitet werden sollten, wurden bei 13000 rpm für 5 min zentrifugiert, der Überstand in ein neues Gefäß überführt und der Proteingehalt der Lösung bestimmt.

2.4.7 Herstellung von Proteinextrakten aus Gewebe

Entnommenes Tumorgewebe wurde in flüssigem Stickstoff in einem Mörser homogenisiert und anschließend in Lysispuffer (20 mM Tris-HCl, pH 8,07, 100 mM NaCl, 500 mM EDTA, 50 mM DTE und Proteaseinhibitoren (siehe II.2.4.6) aufgenommen. Die Suspension wurde mehrmals in einer kleinen Spritze durch eine Kanüle (26G) geschert und anschließend bei 13000 rpm für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und die Proteinkonzentration wurde bestimmt.

2.4.8 Direkte und Indirekte Immunfluoreszenz

Mit Hilfe der Immunfluoreszenz lassen sich Cytoskelettstrukturen spezifisch im Lichtmikroskop darstellen. Bei der direkten Fluoreszenz werden spezifische Fluorochrom-markierte Agenzien oder Fluorochrom-markierte Antikörper eingesetzt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde Phalloidin, ein Gift des Knollenblätterpilzes „Amanita phalloides“ benutzt, das spezifisch an Aktinfilamente bindet. Für die Darstellung im Mikroskop wurde TRITC- bzw. ALEXA-gekoppeltes Phalloidin benutzt.

Bei der indirekten Immunfluoreszenz verwendet man spezifische Erstantikörper gegen zelluläre Proteine und anschließend spezie-spezifische Zweitantikörper, welche mit Fluorochromen gekoppelt sind.

Für fluoreszenzmikroskopische Studien wurden die Zellen vor der Transfektion auf runden Deckgläschen in 24-Loch-Schalen ausgesät und kultiviert. Um zelluläre Strukturen darstellen zu können, mussten die Zellen fixiert und anschließend permeabilisiert werden.

Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen und für 10 min mit 4% (w/v) Paraformaldehyd in PBS bei Raumtemperatur inkubiert. Die Fixierlösung wurde durch Waschen wie oben entfernt und die Zellen mit TritonX100-Lösung (0,1% (v/v) TritonX100 in PBS) für 2 min inkubiert. Die Tritonlösung wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Die fixierten und permeabilisierten Zellen wurden vor jeder Antikörper-Inkubation mit 1% BSA in PBS für wenige Minuten benetzt und dann in einer feuchten Kammer bei RT für 60 min mit den entsprechenden Erstantikörpern inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 3x mit PBS gewaschen, erneut mit 1% BSA in PBS benetzt und mit dem Zweitantikörper wie oben inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 1x PBS wurden die Zellen kurz in H₂O getaucht und in einem Tropfen Mowiol mit Bleichschutz eingebettet.

Die Färbung mit Phalloidin-TRITC erfolgte zeitgleich mit der Zweitantikörper-Inkubation. Phalloidin-TRITC wurde mit PBS verdünnt und bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.

Mowiol: 20 g Mowiol 4-88 (Hoechst)
80 ml 1x PBS
ü.N. bei Raumtemperatur rühren lassen
40 ml Glycerin (reinst) zugeben und ü.N. rühren lassen
Zentrifugation für 1h bei 31000 rpm und Raumtemperatur
den Überstand abnehmen und im Dunkeln bei 4°C lagern

Bleichschutz: 2,5 g n-Propylgallat
50 ml 1x PBS
50 ml Glycerin (reinst)
ü.N. rühren lassen und bei 4°C im Dunkeln lagern

Mowiol und der Bleichschutz werden im Verhältnis 3:1 gemischt. Die Präparate wurden 24 h im Dunkeln getrocknet und bei 4°C im Dunkeln gelagert.

2.4.9 „Spreading“ von Zellen

In diesem Versuchsansatz wird das Absetzverhalten von Zellen untersucht. Eine definierte Anzahl von Zellen wird auf Deckgläschen ausgesät und nach 30 und 60 min fixiert. Die Zellen werden permeabilisiert, das Cytoskelett angefärbt und das Präparat in Mowiol eingebettet. Anschließend zählt man die sich bereits zum Zeitpunkt der Fixierung abgesetzten Zellen aus.

Es wurden $4,4 \times 10^4$ Zellen/Deckgläschen ausgesät und nach 30 min und 60 min fixiert (siehe 2.4.8). Nach der Permeabilisierung der Zellen wurde das Aktin-Cytoskelett mit Phalloidin-TRITC gefärbt und das Präparat in Mowiol eingebettet. Anschließend wurden die abgesetzten versus nicht-abgesetzter Zellen ausgezählt.

2.4.10 Wachstumskurven von Zellen

Krebszellen haben eine erhöhte Proliferationsrate und stellen keine hohen Anforderungen an das sie umgebende Medium, wie den Gehalt an Wachstumsfaktoren, während „normale“ Zelllinien eine reduzierte Proliferationsrate aufweisen und mit verminderter Teilungsaktivität auf einen reduzierten Gehalt an Wachstumsfaktoren reagieren. Diese Unterschiede kann man durch Wachstumskurven darstellen.

Alle Wachstumskurven wurden mit dem Medium DMEM und einer reduzierten FCS-Konzentration (5%) durchgeführt. Es wurden keine Antibiotika zugesetzt. Außerdem musste darauf geachtet werden, das die Zellen aus einer exponentiell wachsenden Kultur stammten. Es wurden pro 6 cm Zellkulturschale $2,5 \times 10^4$ Zellen ausgesät (Tag 1). Dann wurde bis Tag 11 täglich die Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

2.4.11 Wachstum von Zellen in Weichagar

Krebszellen können im Gegensatz zu normalen Zellen verankerungsunabhängig wachsen. Dies kann man untersuchen, indem Zellen in Weichagar kultiviert werden. Krebszellen sind auch in dieser Umgebung in der Lage sich zu teilen und bilden Kolonien, während nicht-tumorigene Zellen als Einzelzellen verbleiben.

Es musste darauf geachtet werden, dass die Zellen aus einer exponentiell wachsenden Kultur stammten. Es wurden zwei Agarose-Stammlösungen mit 0,6% und 1,2% Agarose TypVII (Sigma-Aldrich) in H_2O_{MQ} hergestellt, autoklaviert und bei 45°C im Wasserbad flüssig gehalten. Anschließend wurden folgende Bestandteile zusammengegeben, gemischt und je Zelllinie vier 6 cm Zellkulturschalen befüllt:

Grundagar:	2 ml FCS
	9 ml 1,2%ige Agarose-Stammlösung
	9 ml steriles, doppelkonzentriertes Medium(DMEM)

Alle Bestandteile sollten vor dem Zusammengeben auf 37°C erwärmt sein und jede Zellkulturschale wurde mit 4 ml Grundagar befüllt. Das Ganze wurde zum Aushärten 1 h bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Überschichtung des Grundagars erfolgte mit dem Überschichtungsagar, der sich folgendermaßen zusammensetzt:

Überschichtungsgagar: 1,5 ml FCS
6,75 ml 0,6%ige Agarose-Stammlösung
6,75 ml steriles, doppelkonzentriertes Medium(DMEM)
Zellsuspension ($2,5 \times 10^4$ Zellen/Zellkulturschale)

Auch hier wurden alle Bestandteile erwärmt und jede Zellkulturschale wurde mit 3,5 ml Überschichtungsgagar befüllt. Nach dem Aushärten wurden die Zellkulturschalen 2 bis 4 Wochen bei 37°C inkubiert und schließlich die entstandenen Zellklone ausgezählt.

2.4.12 Wachstum im Matrigel

Das Anheftungs- und das Differenzierungsvermögen von normalen oder transformierten Zellen lässt sich durch Wachstum im oder auf Matrigel untersuchen. MatrigelTM Basement Membrane Matrix (BD Biosciences, Bedford) wird aus dem Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) Maussarcom extrahiert und ist in seiner Zusammensetzung der extrazellulären Matrix ähnlich. Die Hauptkomponente ist Laminin und als weitere Bestandteile sind Kollagene, Proteoglykane und Wachstumsfaktoren vorhanden (Kleinman et al., 1982).

Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt und alle Materialien wurden auf 4°C vorgekühlt, da das flüssige Matrigel bei 22°C anfängt seine Konsistenz zu verändern und gelartig wird. 100 µl Medium wurden mit 100 µl Matrigel gemischt und in eine 4-Loch-Schale gefüllt. Nach 30 min Inkubation bei 37°C wurden auf die Matrigelschicht 5×10^4 Zellen in 0,5 ml Medium ausgesät. Die Zellen wurden 48 h kultiviert und dann photographisch dokumentiert.

2.4.13 Injektion in Nacktmäuse

Den stärksten Hinweis für die Tumorigenizität von Zellen liefert die Injektion der Zellen in Nacktmäuse. Diese Mäuse haben ein supprimiertes Immunsystem und generieren nach einigen Wochen Tumoren, wenn die Zellen ein tumorigenes Potential besitzen.

Der Versuch wurde in Kooperation mit der Dr. W. Arnold von der Firma atugen AG (Berlin-Buch) durchgeführt. Für den Versuch wurden 5 bis 6 Wochen alte weibliche Mäuse mit der Stammbezeichnung NMRI-nu/nu verwendet. Pro Versuchsansatz wurden zwei Zellzahlen (1×10^5 und 1×10^6 Zellen) in 0,1 ml Medium subkutan in die linke Bauchhälfte injiziert. Die entstehenden Tumoren wurden wöchentlich vermessen und das Volumen errechnet.

III. Ergebnisse

1. Herstellung stabil transfizierter CAL51 Zellklone

Bereits im Vorfeld dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der Profilinspiegel in Brustkrebszellen im Vergleich zu normalen Zellen reduziert ist und dass die Anhebung des zellulären Profilingsgehalts durch Expression von rekombinantem Profilin I zur Unterdrückung des tumorigenen Phänotyps dieser Zellen führte (Janke et al., 2000). Zur detaillierten Analyse der zellulären Funktion von Profilin bei der Tumorsuppression sollte der Profilinspiegel in der Brustkrebszelllinie CAL51 mit funktionellen Profilinmutanten erhöht werden. Es ist bisher nicht geklärt, ob der Einfluss Profilins auf die Aktinpolymerisation oder die Bereitstellung von Profilin durch PIP_2 an der Zellmembran entscheidende Faktoren für die Tumorsuppression sind. Eventuell spielt auch die Rekrutierung von Profilin durch Poly-Prolin-Liganden eine tragende Rolle in der Suppression der Tumorigenizität. Durch die Anhebung des Profilinspiegels mit Bindungsmutanten, könnte man genauere Aussagen über die zelluläre Funktion oder den Mechanismus der Tumorsuppression durch Profilin in Brustkrebszellen machen.

Dazu wurde die Brustkrebszelllinie CAL51 mit Expressionsvektoren, die für verschiedene Profilinmutanten kodieren, stabil transfiziert. Es wurden Mutanten verwendet, die in ihrer Wechselwirkung mit Aktin (Schluter et al., 1998), PIP_2 (Sohn et al., 1995) oder Poly-Prolin-Liganden (Bjorkegren et al., 1993) gestört sind und die Bindung von Profilin an den jeweiligen Liganden in der Zelle nicht mehr gewährleistet ist.

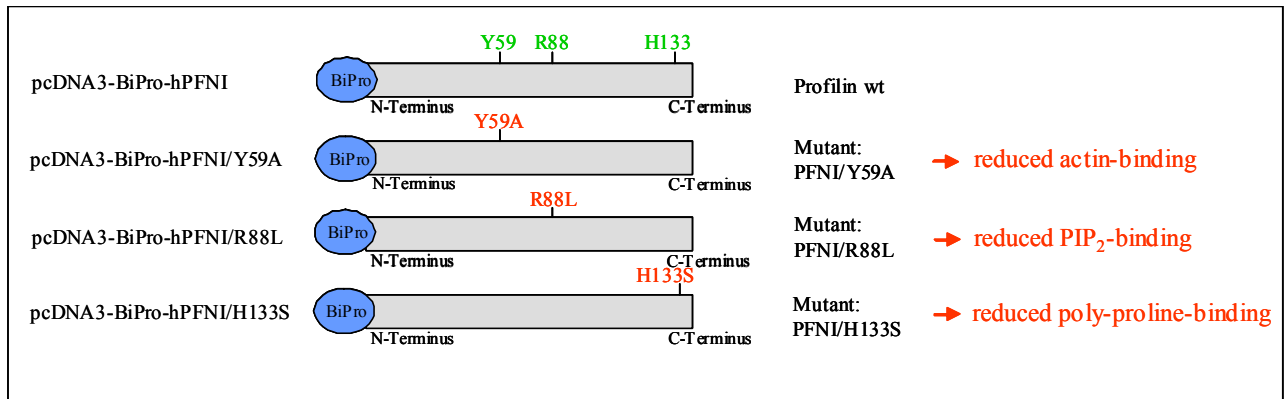


Abb. 8: Schematische Darstellung der verwendeten Profilinmutanten

Neben der humanen Profilin I-cDNA wurden drei Profilinmutanten für die stabile Transfektion verwendet. Alle Profile sind mit dem BiPro-Epitop tag, das N-terminal lokalisiert ist, fusioniert und in den eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3 der Firma Invitrogen kloniert (siehe auch II.1.5). Die Mutante PFNI/Y59A weist im Vergleich zu Wildtyp Profilin eine verringerte Affinität gegenüber Aktin auf (Schluter et al., 1998), die Mutante PFNI/R88L hat eine reduzierte Bindung an PIP₂ (Sohn et al., 1995) und die Mutante PFNI/H133S ist in ihrer Interaktion mit Poly-Proline-Liganden gestört (Bjorkegren et al., 1993). Die Mutanten wurden freundlicherweise von Dr. K. Schlüter zur Verfügung gestellt.

Die Mutanten und Wildtyp Profilin tragen N-terminal eine kurze Aminosäuresequenz (siehe Abbildung 8), das BiPro-Epitop tag, damit die Expression des rekombinanten Profilins in den Zellextrakten per Immunblot vom endogenen Profilinanteil differenziert werden kann.

Alle cDNAs befinden sich in dem eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3-BiPro, welcher das Neomycinresistenzgen trägt. Dieses Resistenzgen ermöglicht die Selektion der stabil transfizierten Zellklone mit dem Aminoglykosidantibiotikum Geneticin (G418), das durch Bindung an die 80S-Ribosomen die Proteinbiosynthese von eukaryontischen Zellen blockiert. Die Zelllinie CAL51 wurde mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert. Nach dreiwöchiger Selektion wurden Zellklone isoliert, die auf die Expression der BiPro-markierten Profile im Immunblot analysiert wurden. Für die Positiv-Kontrolle in den späteren Untersuchungen wurden zusätzlich Zellklone generiert, die stabil BiPro-markiertes Wildtyp Profilin I exprimierten. Als Negativ-Kontrolle wurden CAL51 Zellen mit dem leeren pcDNA3-Vektor transfiziert. Pro Profilinmutante wurden ca. 80 Klone isoliert, von denen etwa ein Drittel eine Expression der rekombinanten BiPro-markierten Profile zeigten.

Basierend auf dieser Auswahl ergaben sich pro Profilinmutante zwei bis drei Zellklone, deren rekombinanter Profilinanteil im Immunblot quantifiziert werden sollte.

2. Bestimmung der Profilinexpression in den stabilen Zellklonen

Aus den Transfektionen sind drei stabile Zellklone, die die Aktin-Bindungsmutante des Profilins exprimieren (PFNI/Y59A-1,-2 und -3), drei Zellklone, die die PIP₂-Bindungsmutante des Profilins exprimieren (PFNI/R88L-1,-2 und -3) und zwei Zellklone, die die Poly-Prolin-Mutante des Profilins exprimieren (PFNI/H133S-1 und -2) hervorgegangen. Die Expression des rekombinanten Profilins wie des endogenen Profilins sollte per quantitativer Immunblots analysiert werden. Dabei konnte die endogene Profilinexpression separat von der transfizierten Profilinexpression aufgrund der BiPro-markierten transfizierten Profilin-Konstrukte betrachtet werden.

Gleiche Gesamtproteinmengen wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend wurde im Immunblot der endogene und der rekombinante Profilinanteil nachgewiesen (Abb.9a). Maßgeblich hierfür war der Auftrag gleicher Proteinmengen auf das Gel, was durch den Nachweis des Proteins Tubulin kontrolliert wurde. Tubulin gilt als Haushaltsprotein und wird vermutlich in allen Zelllinien gleich stark exprimiert. Für die Quantifizierung der Profilinexpression wurde pro SDS-PAA-Gel ein Profilin-Standard mit entweder rekombinantem Profilin I oder BiPro-markiertem Profilin I aufgetragen (Abb. 9b). Nach der ECL-Entwicklung wurden die Protein-Banden densitometrisch vermessen und mit dem Computerprogramm *Easywin* (Herolab) quantitativ ausgewertet, eine Eichgerade für den Profilin-Standard (Abb. 9b) erstellt und der Profilingehalt in den Zellextrakten berechnet.

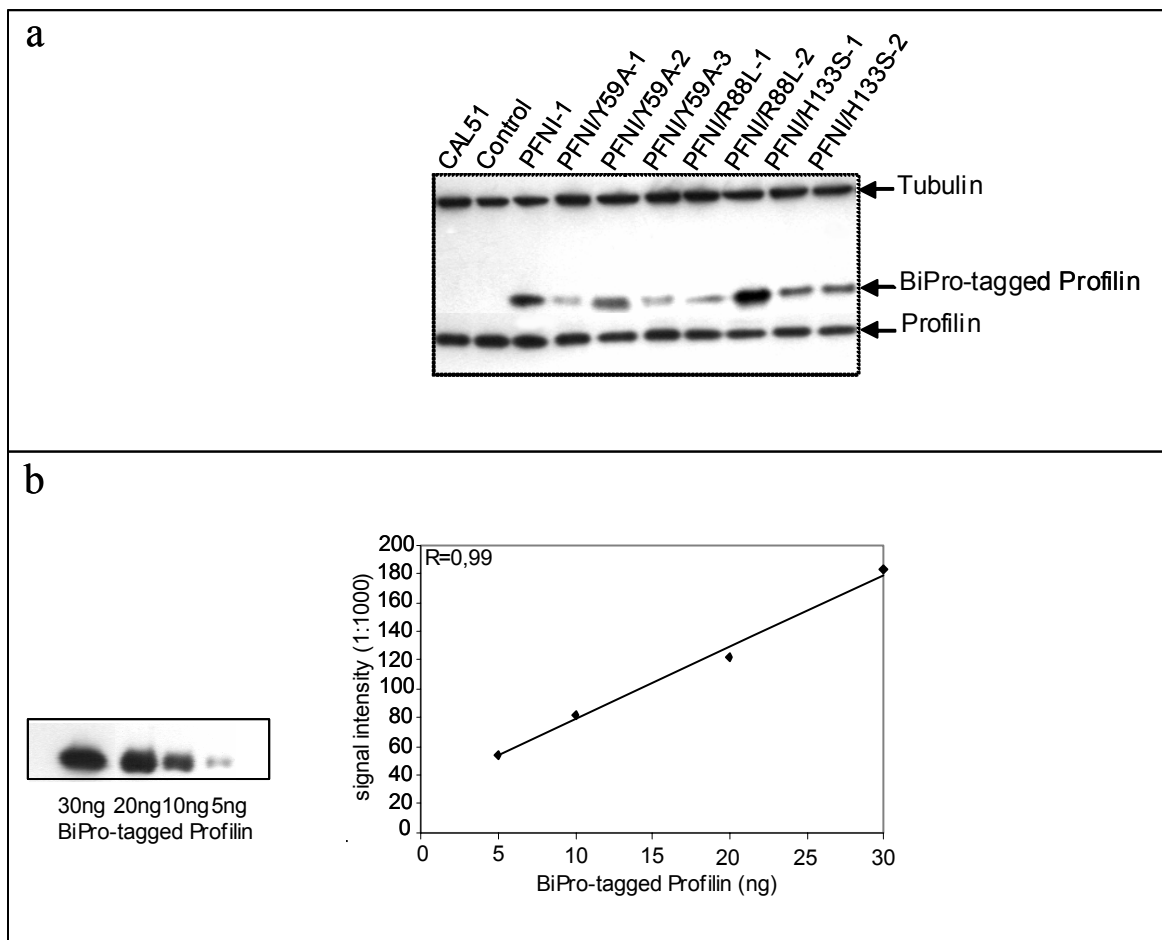


Abb.9: Endogene und rekombinante Profilinexpression in den stabilen CAL51 Zellklonen

CAL51 Zellen wurden stabil mit BiPro-Profilin I und den drei Profilinmutanten PFNI/Y59A, PFNI/R88L und PFNI/H133S transfiziert, Zellklone generiert und die Expressionsstärke des endogenen und rekombinanten Profilins im Immunblot bestimmt. (a) Der Nachweis des endogenen Profilins erfolgte mit einem monoklonalen anti-Profilin-Antikörper 2H11, während der rekombinante Profilinanteil mit dem anti-BiPro-Antikörper 4A6 nachgewiesen wurde. Als Kontrolle diente die mit dem Vektor pcDNA3 transfizierte Zelllinie CAL51 (Control). (b) Für die quantitative Analyse der Expressionsspiegel wurde ein Profilin-Standard mit rekombinantem Protein aufgetragen. Der lineare Bereich für beide Antikörper liegt zwischen 5 ng und 30 ng Protein. Eine Eichgerade wurde erstellt und über die Geradengleichung konnten die Expressionsstärken berechnet werden.

Der Nachweis der BiPro-markierten Profileine im Immunblot lässt darauf schließen, dass die CAL51 Zellklone die entsprechenden cDNAs in ihr Genom integriert haben und die rekombinanten Proteine stabil exprimieren. Die Ausgangszelllinie CAL51 und die Vektor-transfizierte Kontrollzelllinie zeigen kein Signal mit dem anti-BiPro-Antikörper 4A6. Folglich zeigt dieser Antikörper keine Kreuzreaktionen mit anderen Proteinen. Der Vergleich des Tubulingehalts in den Zellextrakten dokumentiert, dass gleiche Mengen Gesamtprotein aufgetragen wurden und ist Voraussetzung für eine Quantifizierung der Profilin-Banden.

Die ermittelten Expressionsstärken für die einzelnen CAL51 Zellklone sind in Abbildung 10 in einem Diagramm dargestellt.

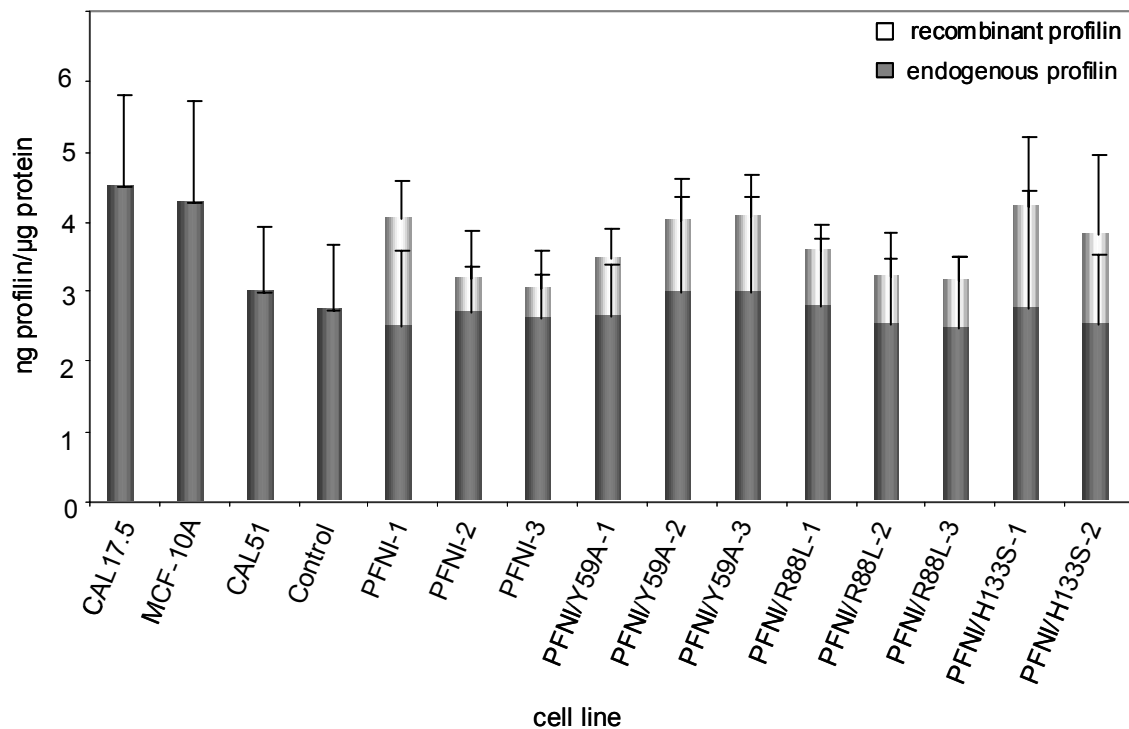


Abb.10: Profilinexpression der CAL51 Zellklone

Es sind die im Immunblot quantitativ ermittelten Profilinexpressionsspiegel gezeigt, wobei die grauen Balken den endogenen Profilinspiegel und die weißen Balken den transfizierten Profilinanteil darstellen. Die Brustepithelzelllinie MCF-10A hat im Vergleich zur Brustkrebszelllinie CAL51 einen deutlich erhöhten Profilinhalt. Die generierten Klone haben aufgrund des rekombinanten Profilinanteils einen Gesamtprofilinhalt, der dem Profilinhalt von MCF-10A Zellen entspricht. Auch CAL17.5 Zellen, die aus einem Chromosomentransfer hervorgegangen sind und einen normalen Phänotyp haben, zeigen eine erhöhte Profilinexpression. Die Standardabweichungen ergeben sich aus mindestens zehn ermittelten Werten.

Für die Quantifizierung der Profilinexpressionen wurden pro Zelllinie mindestens zehn Immunblots mit Zellextrakten aus unterschiedlichen Passagen und unterschiedlichen Aufarbeitungen ausgewertet.

Die Brustkrebszelllinie CAL51 hat im Vergleich zur normalen Brustepithelzelllinie MCF-10A einen reduzierten Profilinhalt, wie es in der Literatur beschrieben wurde (Janke et al., 2000). Die Zelllinie CAL17.5 ist aus einem Chromosomentransfer, bei dem das Profilin übertragen wurde (Theile et al., 1995), hervorgegangen. Sie zeigt einen deutlich erhöhten Profilinspiegel, welcher mit der Profilinexpression in MCF-10A Zellen vergleichbar ist. Die

Analyse des endogenen Profilinspiegels in den transfizierten CAL51 Zellklonen ergab, dass durch die Transfektion die endogene Profilinexpression nicht moduliert wurde.

Der Profilingehalt wurde in den generierten Zellklonen um 29% bis 64% im Vergleich zum endogenen Profilingehalt durch die Transfektionen angehoben. Für die Profilinmutante PFNI/Y59A ergibt sich in allen drei charakterisierten Klonen ein Gesamtprofilingehalt, der dem 1,3-fachem Profilingehalt der Krebszelllinie entspricht. Klone, die die Poly-Prolin-Bindungsmutante von Profilin exprimieren, zeigen ein ähnliches Ergebnis. Zwei (PFNI/R88L-2 und -3) der Klone, welche die PIP₂-Bindungsmutante von Profilin exprimieren, haben einen 1,5-fachen Profilingehalt im Vergleich zu CAL51 Zellen und der Klon PFNI/R88L-1 liegt im Bereich der anderen Mutanten. Die Positiv-Kontrolle (PFNI-1) hat mit einem 1,6-fachem Profilinspiegel den höchsten Gesamtprofilingehalt. Betrachtet man die Epithelzelllinie MCF-10A (Gesamtprofilingehalt: 1,4-fach im Vergleich zu CAL51) und den CAL17.5 Zellklon (Gesamtprofilingehalt: 1,5-fach im Vergleich zu CAL51), so erreichen die stabil exprimierenden Klone einen Gesamtprofilingehalt, wie er in normalen Epithelzellen zu finden ist.

Festzuhalten ist, dass alle generierten CAL51 Zellklone eine moderate Überexpression der rekombinanten Profileine zeigen. Dies ist ein wichtiges Kriterium für den Vergleich der verschiedenen Klone untereinander und im Vergleich mit der normalen Brustepithelzelllinie MCF-10A. Sehr starke Überexpressionen von Proteinen können Effekte erzeugen, die nicht auf das Protein zurückzuführen sind, sondern aufgrund der massiven Expression erzeugt werden. In den weiteren Versuchen soll der tumorigene Phänotyp der einzelnen CAL51 Klone charakterisiert werden.

3. Charakterisierung des tumorigenen Phänotyps der stabilen CAL51 Zellklone

Die Anhebung des Profilinspiegels durch die Transfektion der Profilin I-cDNA in der Brustkrebszelllinie CAL51 hat zur Suppression der tumorigenen Eigenschaften geführt und in dieser Arbeit sollte untersucht werden, welche Liganden-Bindungsfähigkeit von Profilin für die Tumorsuppressoraktivität notwendig ist. Hierfür wurde der Profilinspiegel in CAL51 Zellen mit funktionellen Profilinmutanten angehoben. Pro Mutante wurde der Profilingehalt von 2 bis 3 Zellklone detailliert analysiert, wobei alle untersuchten Klone moderate

Profilinexpressionen aufweisen, die mit normalen Zellen vergleichbar sind. Mit diesen Klonen sollte weiter verfahren werden.

Der tumorigene Phänotyp sollte durch verschiedene Versuche analysiert werden. Charakteristische Merkmale für einen tumorigenen Phänotyp kann man an Veränderungen in der Zellmorphologie und im Mikrofilamentsystem erkennen. Typische Untersuchungen, wie die Bestimmung der Proliferationsrate, des verankerungsunabhängigen Wachstums oder des Absetzverhaltens von Zellen, lassen Rückschlüsse auf die Tumorigenizität zu. Das Differenzierungsvermögen von Zellen in Matrigel und die Tumorbildung in der Nacktmaus sind weitere Experimente, die Hinweise auf den tumorigenen Phänotyp von Zellen ergeben.

3.1 Morphologie der CAL51 Zellklone

Aufgrund der Integration von Fremd-DNA in das Genom von Zellen und anschließender Selektionierung mit Antibiotika kann sich die Morphologie der Transfektanten massiv verändern. Bei der Auswahl der stabil transfizierten Zellklone traten Zellen mit extrem großen Zellkernen und Cytoplasma auf. Diese Zellen wurden auch bei Vektor-transfizierten CAL51 Zellen beobachtet, so dass diese Veränderungen durch die Transfektion und anschließende Selektion hervorgerufen wurden und nicht auf die Expression der Profiline zurückzuführen sind. Mit diesen Klonen wurde nicht weiter gearbeitet.

Für andere Cytoskelettproteine, die als Tumorsuppressor wirken, sind durch die Überexpression morphologische Veränderungen beschrieben. Die Zellen wuchsen in dichten, inselartigen Gruppen, was für normale Epithelzellen typisch ist, während die Krebszellen weiterhin in losen Verbänden wuchsen (Mahadev et al., 2002). Abbildung 11 dokumentiert die Morphologie der stabil exprimierenden Zellklone. Die Expression der Mutanten und von Wildtyp Profilin hat auf die Morphologie der Zellen offenbar keinen Einfluss.

Daraufhin wurde die Organisation des Cytoskeletts in den stabil exprimierenden CAL51 Zellklonen detailliert charakterisiert.

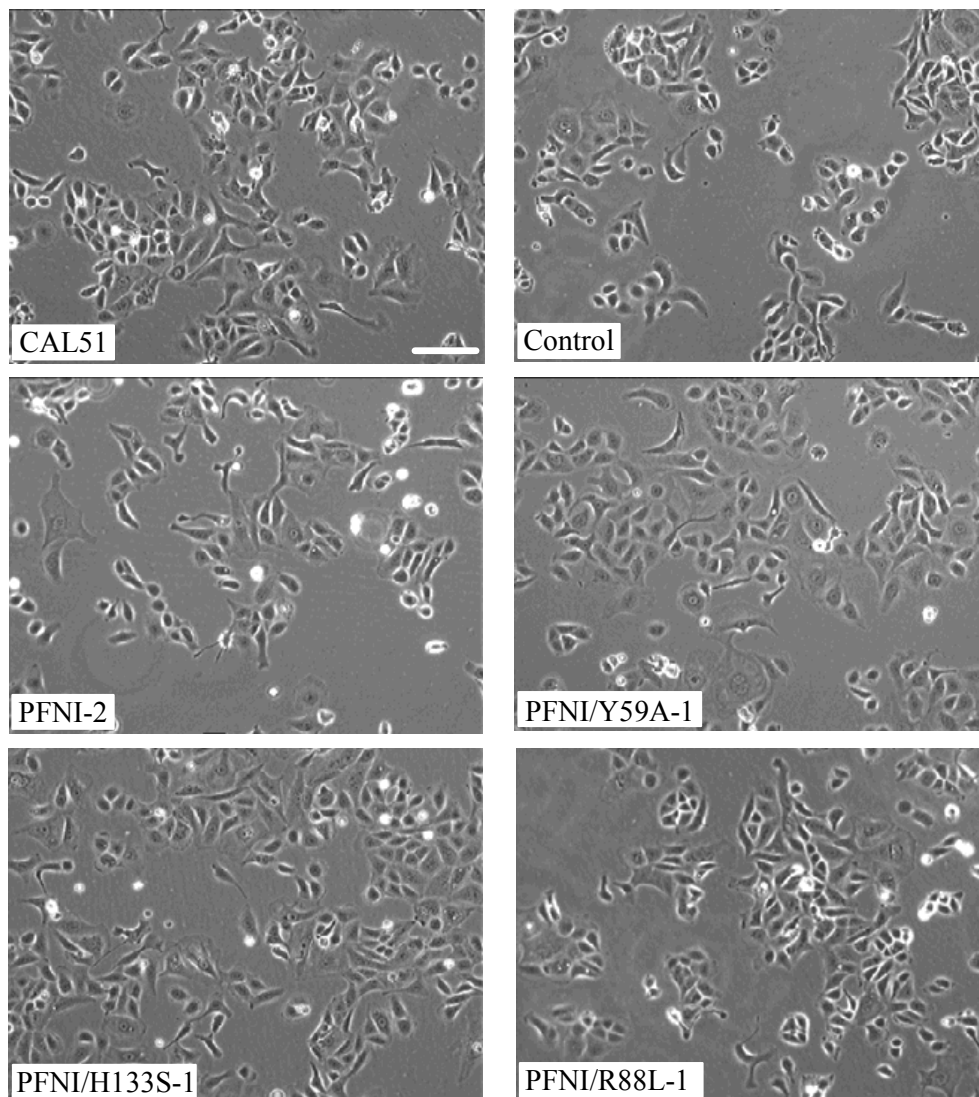


Abb.11: Morphologie der CAL51 Zellklone

Gleiche Zellzahlen von CAL51 Zellen, der Vektor-transfizierten Zelllinie (Control), der Profilin I-, PFNI/Y59A-, PFNI/H133S- und PFNI/R88L-transfizierten Zelllinien wurden ausgesät, die Zellen zwei Tage kultiviert und anschließend photographisch dokumentiert. Die Aufnahmen wurden mit 10-facher Vergrößerung erstellt. Der Balken entspricht 100 µm.

3.2 Organisation des Mikrofilamentsystems

Das Mikrofilamentsystem von Krebszellen ist häufig diffuser ausgebildet und nicht so gut strukturiert wie bei normalen Zellen. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. S. Scherneck konnte eine Zunahme von Stressfasern und besser organisierte, gebündelte Aktinfilamente nach Erhöhung des Profilinspiegels mit Profilin I in CAL51 Zellen

dokumentiert werden. Darüber hinaus zeigten diese Zellen stark ausgebildete Adhäsionsgürtel, wie es für Epithelzellen typisch ist. Diese strukturellen Veränderungen sollten auch für die in dieser Arbeit generierten Zellklone untersucht werden.

Die Zellen wurden ausgesät, für die Immunfluoreszenz vorbereitet wie unter II.2.4.8 beschrieben und das Aktin-Cytoskelett mit Alexa-488-gekoppeltem Phalloidin dekoriert. Die stabil transfizierten Profilinmutanten wurden mit dem anti-BiPro-Antikörper 4A6 und einem Alexa-568-gekoppelten Zweitantikörper nachgewiesen. Für die Detektion von endogenem Profilin in CAL51 Zellen wurde der monoklonale anti-Profilin-Antikörper 2H11 verwendet. Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Präparate wurde in Zusammenarbeit mit Dr. M. Rhode (GBF, Braunschweig) an einem Konfokalem Fluoreszenzmikroskop durchgeführt. Die Intensität der Fluoreszenz in CAL51 Zellen (Abb. 12) ist gering, was mit der reduzierten Expression von Profilin in diesen Zellen zu erklären ist. Dem entgegen ergibt die Expression der BiPro-markierten Profilinmutanten stärkere Fluoreszenzintensitäten und es ist erkennbar, dass alle Mutanten in Bereichen hoher Aktindynamik lokalisieren. Die Mutationen beeinflussen die typische Lokalisation von Profilin nicht.

Das Cytoskelett der CAL51 Zellen ist ausgeprägt, es sind Adhäsionsgürtel und Stressfasern vorhanden. Vergleicht man die Organisation der Aktinfilamente in den stabil exprimierenden Transfektanten mit der Ausgangszelllinie CAL51, so ergeben sich keine großen Unterschiede. Es gibt sowohl Zellen, die ausgeprägte Adhäsionsgürtel und Stressfasern besitzen (siehe Abb. 12; PFNI/H133S-1), wie auch Zellen, die wenig F-Aktin-Strukturen haben (siehe Abb. 12; PFNI/Y59A-2). Dies ist bei allen Klonen aufgetreten, die die Profilinmutanten exprimieren. Lediglich Profilin I-exprimierende Zellen (Abb. 12; PFNI-1) zeigen in allen Zellen stärker organisierte Aktinfilamente. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. S. Scherneck konnte wir schon früher dokumentieren, dass Profilin I-transfizierte CAL51 Zellen stärker ausgebildete Aktinfilamente besaßen als CAL51 Zellen (Janke et al., 2000). Zusammenfassend ist festzuhalten, dass keine drastischen Veränderungen in der Morphologie und in der Organisation des Cytoskeletts durch die Expression der Profilinmutanten in der Krebszelllinie CAL51 aufgetreten sind.

Die Homogenität aller Zellklone wurde durch Auszählung der transfizierten Zellen bestimmt (Daten nicht gezeigt), wobei alle verwendeten Zellklone zu 89% bis 99% homogen waren. Dies bedeutet, dass die Ergebnisse in den Versuchen durch die Expressionen der Mutanten hervorgerufen werden und dass die Ergebnisse nicht durch die Inhomogenität der stabil transfizierten Zellklone verfälscht sind. Lediglich einer der PFNI/Y59A-Klone (PFNI/Y59A-1) war nur zu 80% homogen.

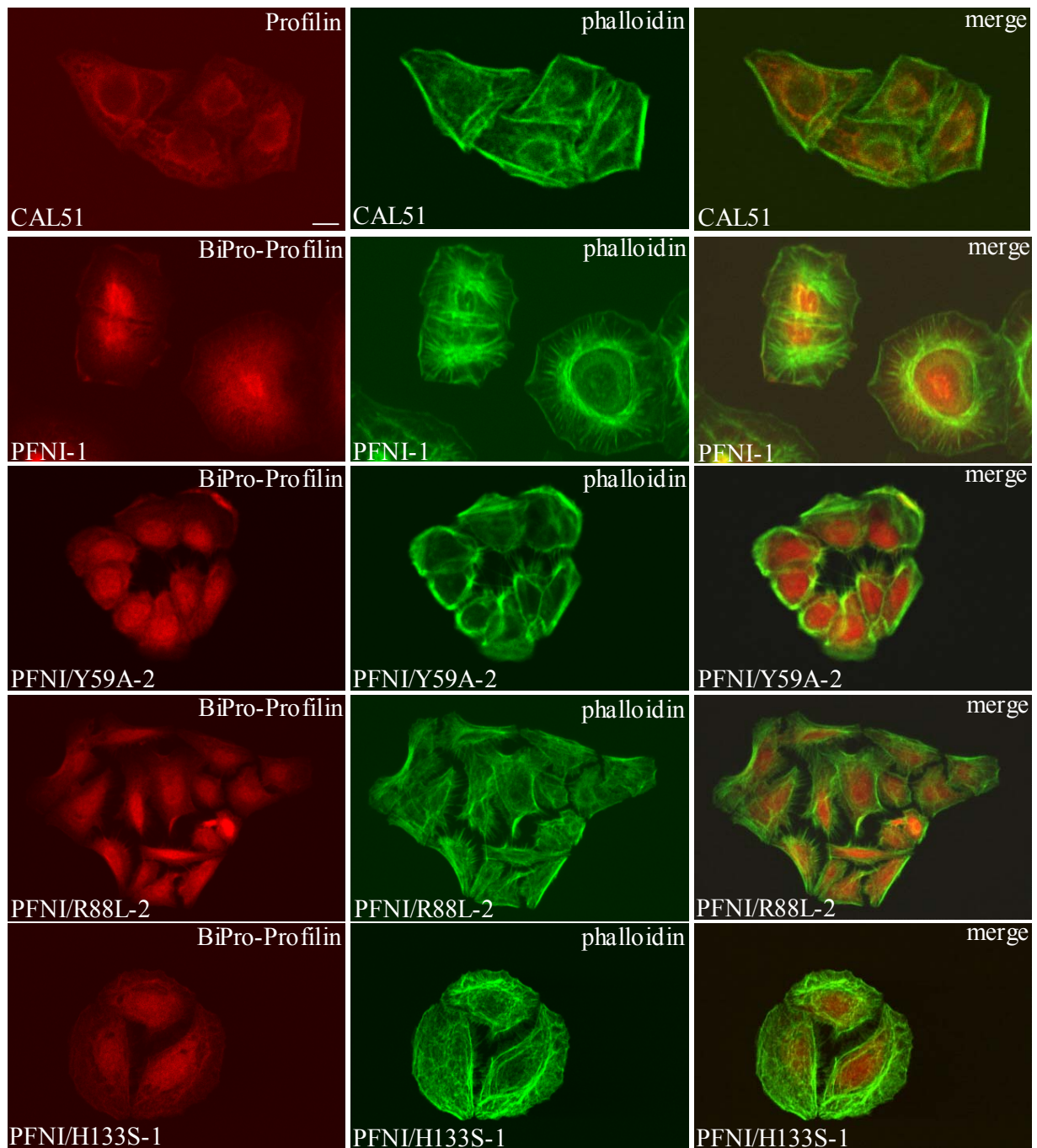


Abb.12: Darstellung des Aktin-Cytoskeletts in den stabilen CAL51 Klonen

CAL51 Zellen, Profilin I-exprimierende CAL51 Zellen (PFNI-1), PFNI/Y59A-exprimierende CAL51 Zellen, PFNI/R88L-exprimierende CAL51 Zellen und PFNI/H133S-exprimierende CAL51 Zellen sind dargestellt. Die Aufnahmen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. M. Rhode (GbF, Braunschweig) an einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop erstellt. Endogenes Profilin wurde mit dem anti-Profilin Antikörper 2H11 identifiziert (Profilin), die BiPro-markierten Profile wurden mit dem BiPro-Antikörper 4A6 nachgewiesen (BiPro-Profilin) und das Aktin-Cytoskelett wurde durch Dekoration mit ALEXA-488-Phalloidin dargestellt (phalloidin). Überlagerung der entsprechenden Bilder (merge). Der Balken entspricht 10 μm .

3.3 Wachstum der CAL51 Zellklone

Transformierte Zellen und Krebszellen sind durch eine erhöhte Proliferationsrate im Vergleich zu normalen Zellen gekennzeichnet und mit Hilfe von Wachstumskurven lässt sich die Proliferationsrate von Zellen bestimmen. Mit allen im Immunblot charakterisierten CAL51 Zellklonen wurden Wachstumskurven zur Ermittlung der Proliferationsrate durchgeführt. Dem Medium wurde nur 5% FCS zugesetzt, um Unterschiede in der Proliferation aufgrund eines reduzierten Angebots an Wachstumsfaktoren zwischen Krebszellen und normalen Zellen sichtbar zu machen. 2×10^4 Zellen wurden pro Klon auf Zellkulturschalen ausgesät und über neun Tage wurde täglich die Zellzahl bestimmt. In Abbildung 13 ist exemplarisch für einen Klon jeder Profilinmutante und den Kontrollen eine Wachstumskurve dargestellt. Die Generationszeiten wurden aus den Wachstumskurven ermittelt (siehe Tabelle III.1), wobei sich die Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten ergeben.

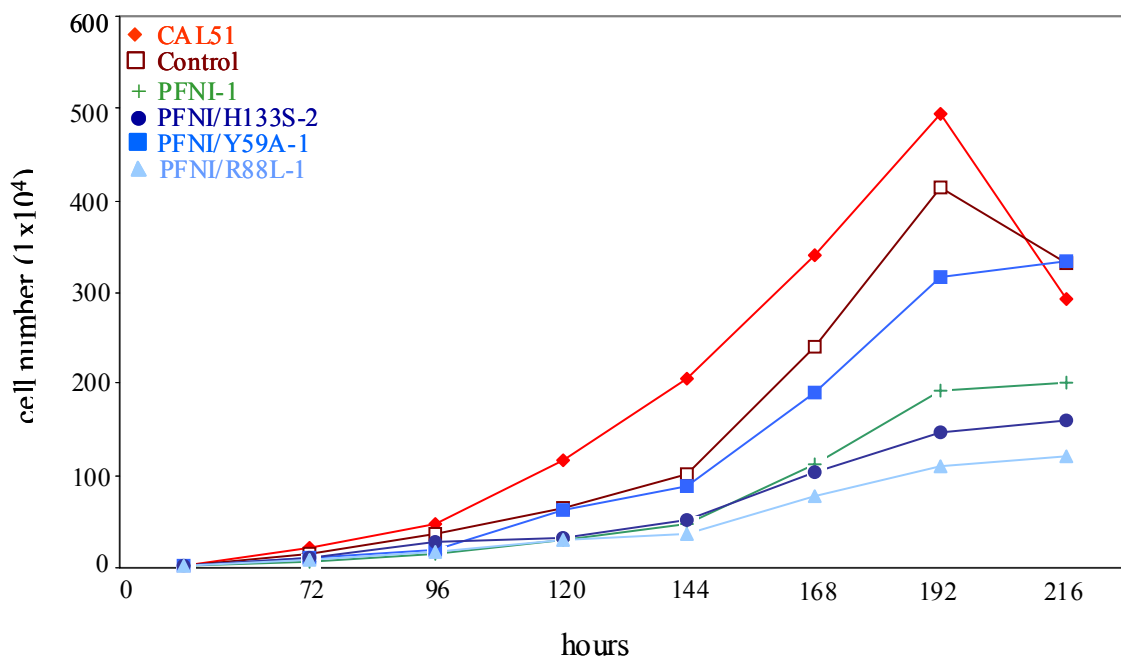


Abb.13: Wachstumskurven der CAL51 Zellklone

Wachstumskurven wurden mit der Ausgangszelllinie CAL51 und mit CAL51 Zellklonen, die mit der Profilin I-cDNA und mit mutierten Profilin-cDNAs (PFNI/Y59A, PFNI/R88L, PFNI/H133S) stabil transfiziert wurden, durchgeführt. Es ist pro Mutante jeweils eine Wachstumskurve von einem Zellklon dargestellt. Die Wachstumskurven wurden in DMEM mit 5% FCS angesetzt und verliefen über einen Zeitraum von neun Tagen. Als Kontrolle diente die pcDNA3-transfizierte CAL51 Zelllinie (Control).

Tab. III.1 Generationszeit der CAL51 Zellklone

Cell Line	Cell Doubling Time [Hours]	SD
CAL51	21.9	3.96
Control	25.8	1.63
PFNI-1	29.6	4.6
PFNI-2	37.9	2
PFNI-3	30.5	7.1
PFNI/Y59A-1	23.2	2.8
PFNI/Y59A-2	29.8	2.4
PFNI/R88L-1	33.0	5.8
PFNI/R88L-2	36.9	2.9
PFNI/H133S-1	33.9	7.3
PFNI/H133S-2	35.4	7

Die Wachstumskurven ergeben unterschiedliche Generationszeiten für die Transfektanten im Vergleich zur Ausgangszelllinie. Die Krebszelllinie CAL51 hat eine hohe Proliferationsrate und wächst von allen untersuchten Zellen am schnellsten (siehe Abb.13). Sehr gut ist die Log-Phase des Zellwachstums zu erkennen, die nach 192 Stunden beendet ist. Eine stationäre Phase ist bei allen Zelllinien außer bei der Ausgangszelllinie und der Negativ-Kontrolle zu erkennen. Nach weiteren 24 Stunden wird die Absterbephase erreicht (nicht in der Abbildung dargestellt). Dies gilt für alle verwendeten Zelllinien. Die Negativ-Kontrolle ist minimal in ihrem Wachstum gehemmt. Die Expression von Wildtyp Profilin, der Poly-Prolin-Bindungsmutante oder der PIP₂-Bindungsmutante Profilins in CAL51 Zellen führt hingegen zu einer deutliche Reduktion des Wachstums. Dies betrifft auch die Generationszeiten der Zellen: Zellklone, welche diese Mutanten oder den Wildtyp exprimieren, haben eine Generationszeit von 31 bis 39 Stunden im Gegensatz zu CAL51 Zellen mit 21,5 Stunden. In der Literatur ist die Verdopplungszeit für die Zelllinie CAL51 mit 13,5 Stunden angegeben (Theile et al., 1995).

Die Expression der Aktin-Bindungsmutante von Profilin resultiert auch in einer Reduktion des Wachstums, aber nicht in dem Maße wie bei den anderen Bindungsmutanten. Die Generationszeiten der Zellklone PFN/Y59A-1, PFNI/Y59A-2 und PFNI/Y59A-3 liegen zwischen 23,2 und 29,8 Stunden.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass eine Erhöhung des Profilinspiegels in CAL51 Zellen mit Wildtyp Profilin I, wie es in unserer früheren Studie schon gezeigt wurde (Janke et al., 2000), zu einer Reduktion der Proliferationsrate führt. Aber auch die Anhebung des Profilin gehalts durch die stabile Expression von Profilin-Bindungsmutanten führt zu verlängerten Generationszeiten. Folglich kann aufgrund der ermittelten Generationszeiten noch keine Aussage über die verschiedenen Liganden-Bindungsfähigkeiten von Profilin in der Tumorsuppression gemacht werden.

3.4 Analyse der Verankerungsunabhängigkeit

Das verankerungsunabhängige Wachstum in Weichagar ist ein weiteres wichtiges Kriterium für die Tumorigenizität von Zellen. Normale, adhärent wachsende Zellen können in Weichagar nicht wachsen. Im Gegensatz dazu sind Krebszellen in der Lage verankerungsunabhängig zu wachsen und in Weichagar dreidimensionale Zellaggregate zu bilden (Freedmann and Shin, 1974; Shin et al., 1975).

Pro Zellkulturschale wurden $2,5 \times 10^4$ Zellen in Agar-haltigem Medium (siehe II.2.4.11) ausgesät, drei Wochen im CO₂-Inkubator inkubiert und anschließend die Koloniezahl bestimmt. Abbildung 14 zeigt das typische Bild der Koloniebildung in Weichagar und in Abbildung 15 ist das Wachstum der CAL51 Zellklone in Weichagar dokumentiert.

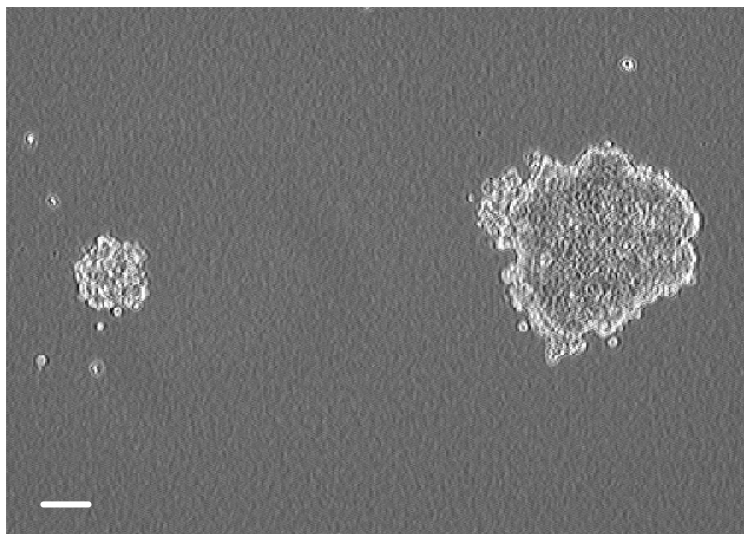


Abb.14: Koloniebildung in Weichagar

In der Abbildung ist die Morphologie der gebildeten Kolonien in Weichagar nach 3 Wochen für CAL51 Zellen gezeigt. Die Zellen liegen überwiegend als dreidimensionale Zellaggregate vor, die nur von tumorigenen Zellen gebildet werden können. Balken: 100 μm .

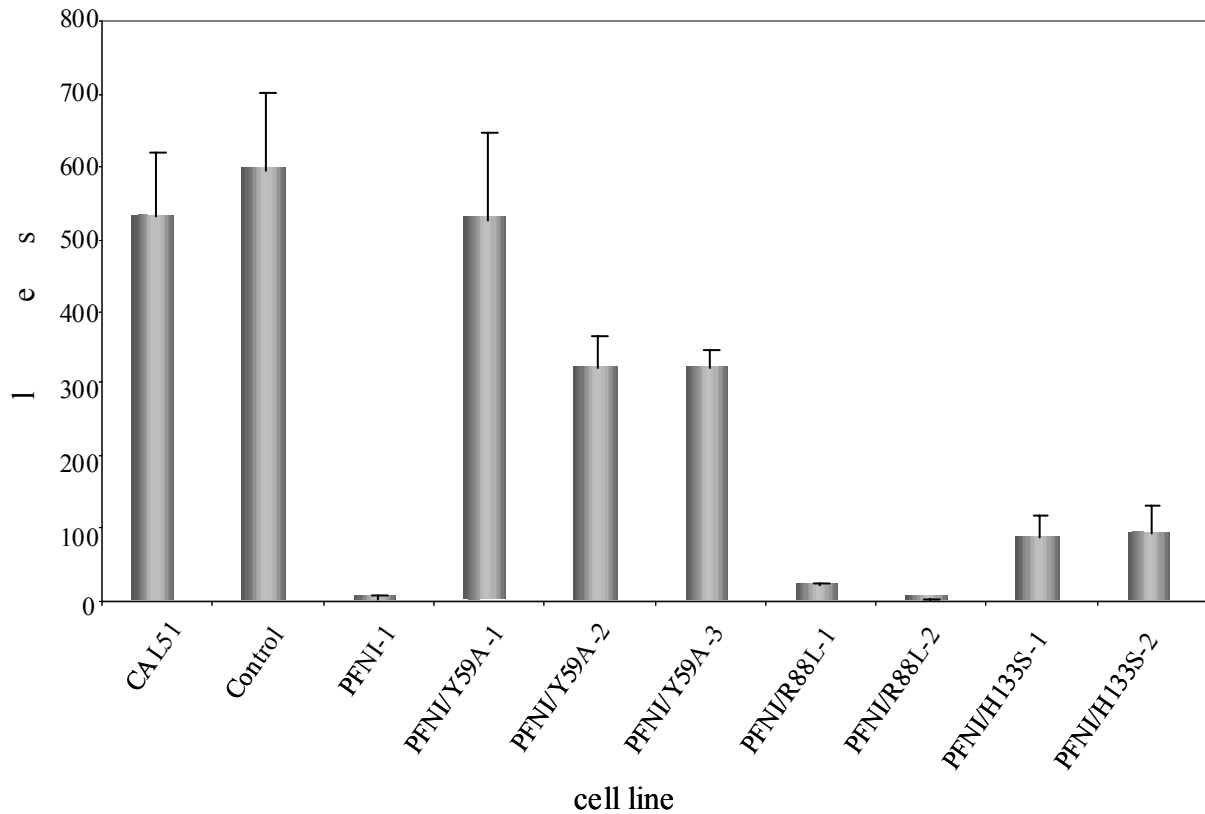


Abb.15: Verankerungsunabhängiges Wachstum der CAL51 Zellklone in Weichagar

Die stabil transfizierten Zellklone wurden in Weichagar kultiviert und der Versuch nach drei Wochen ausgewertet. Es wurden $2,5 \times 10^4$ Zellen in 0,3% Weichagar in Medium ausgesät, drei Wochen bei 37°C, 10% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert und die gebildeten Zellkolonien pro Zellkulturschale ausgezählt. Als Kontrolle diente die pcDNA3-transfizierte CAL51 Zelllinie (Control). Profilinmutanten: PFNI/Y59A (reduzierte Aktin-Bindung), PFNI/R88L (reduzierte PIP₂-Bindung), PFNI/H133S (reduzierte Poly-Prolin-Liganden-Bindung). Die Standardabweichung von jeweils drei unabhängigen Versuchen ist als Fehlerbalken dargestellt.

Die Krebszelllinie CAL51 und die Negativ-Kontrolle zeigen mit 500 bis 600 Kolonien pro Zellkulturschale ein starkes Wachstum in Weichagar (Abb.15), während die Expression von Wildtyp Profilin in diesen Zellen zu einer drastischen Reduktion der Koloniebildung führt (8 Kolonien). Die Expression von Profilinmutanten, die in ihrer Wechselwirkung mit PIP₂ oder Poly-Prolin-Liganden gestört sind, führt ähnlich wie bei Klonen die den Wildtyp exprimieren zur Reduktion des verankerungsunabhängigen Wachstums. Im Gegensatz dazu zeigen Klone, die die Aktin-Bindungsmutante von Profilin exprimieren, weiterhin tumorigenes Verhalten. Sie wachsen verankerungsunabhängig, wobei der Klon PFNI/Y59A-1 eine hohe

Klonierungseffizienz (ca. 500 Kolonien) zeigt und die anderen beiden weniger (ca. 350) Kolonien pro Zellkulturschale bilden. Diesen Unterschied kann man nicht mit den Expressionsstärken der Mutanten PFNI/Y59A erklären. Es wäre denkbar, dass der stark klonierende Zellklon einen höheren Expressionsspiegel der Mutante aufweist und deshalb stärker kloniert als die anderen beiden Zellklone. Jedoch haben alle Klone vergleichbare Expressionsstärken dieser Mutante, so dass der Unterschied durch einen anderen Faktor verursacht wird. Die Bestimmung der Homogenität hatte ergeben, dass der PFNI/Y59A-1 Zellklon mit 80% transfizierten Zellen nicht so homogen ist wie die anderen beiden PFNI/Y59A Zellklone (94% und 98%). Dieser relativ hohe Anteil an nicht-exprimierenden Zellen kann die Ursache für eine stärkere Koloniebildung in Weichagar sein im Vergleich mit den anderen beiden Klonen, da die nicht-exprimierenden Zellen keinen erhöhten Profilinspiegel haben und sich deshalb wie CAL51 Zellen verhalten.

Aus diesem Versuch sind Unterschiede im tumorigenen Phänotyp der stabil exprimierenden CAL51 Zellen hervorgegangen, die in weiteren Versuchen bestätigt werden sollten.

3.5 Analyse des Matrixkontaktes

Mit Hilfe des „Spreading“-Versuchs kann man das Absetzen und das anschließende Ausbreiten von Zellen, und damit die Fähigkeit der Zellen Zell-Matrix-Kontakte zu formieren, untersuchen. Krebszellen können sich nicht so schnell an das Substrat anheften und zeigen eine verlangsamte Ausbreitung im Vergleich zu normalen Zellen.

Eine definierte Zellzahl wurde auf Deckgläschen ausgesät und nach 30 und 60 Minuten fixiert, permeabilisiert und das Aktin-Cytoskelett mit Phalloidin angefärbt. Anschließend wurden die Zellen gezählt. Hierbei wurde der Anteil von abgesetzten, ausgebreiteten und nicht ausgebreiteten Zellen ermittelt. Abbildung 16 zeigt das Verhalten der Zellen im „Spreading“-Versuch.

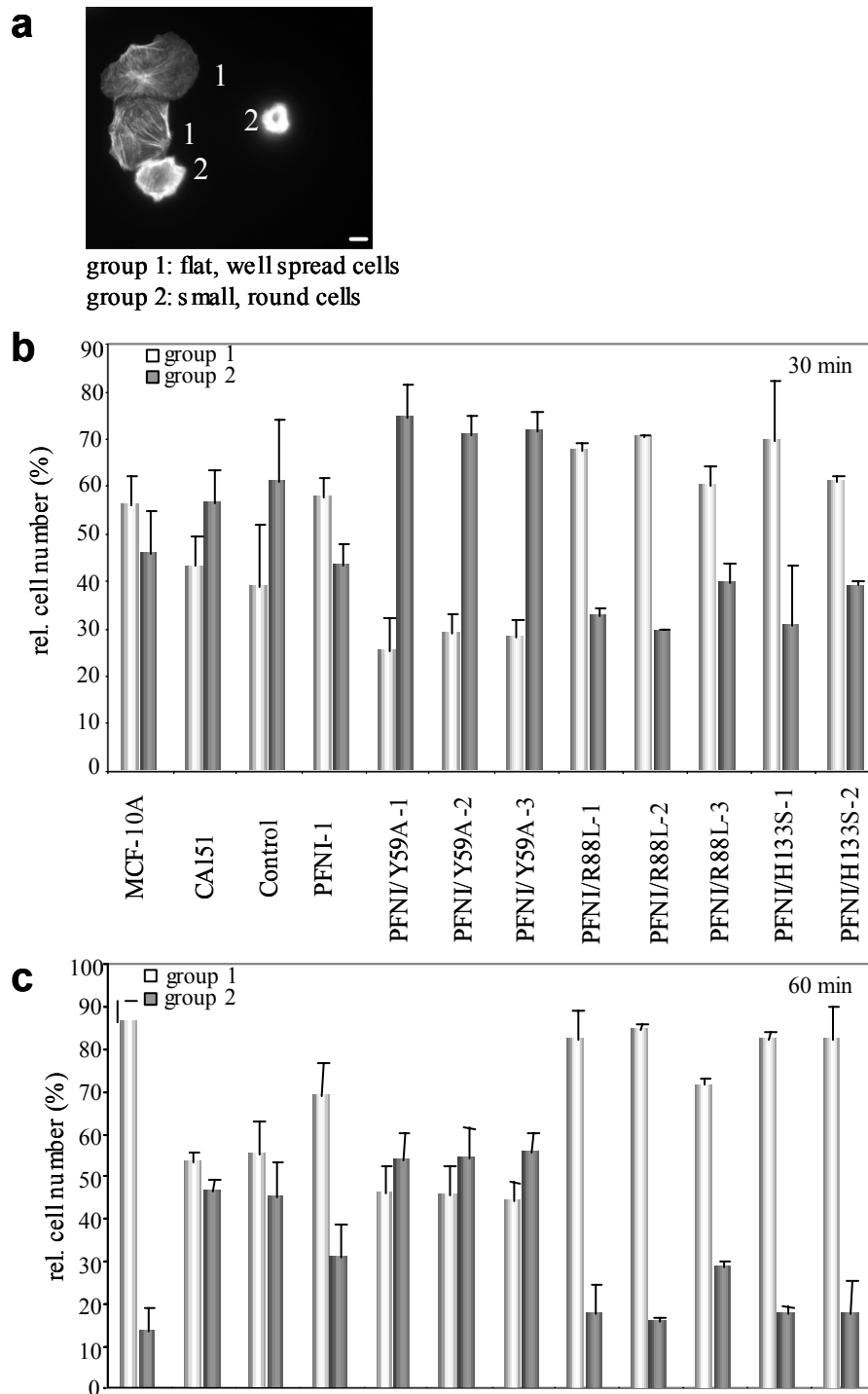


Abb.16: „Spreading“ der CAL51 Zellklone

$4,4 \times 10^4$ Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät und nach 30 Minuten (b) oder 60 Minuten (c) fixiert. Nach der Permeabilisierung folgte die Färbung des Aktin-Cytoskelett mit Phalloidin-FITC und die Präparate wurden eingebettet. Für die Auswertung wurden die Zellen in zwei Kategorien eingeteilt: Abbildung 16a zeigt große, flache, ausgebreitete Zellen (Gruppe 1), die sich von kleinen, runden nicht ausgebreiteten Zellen (Gruppe 2) unterscheiden. Abbildung 16b und c zeigen den Anteil an ausgebreiteten (weiße Balken) und nicht ausgebreiteten (graue Balken) Zellen für die CAL51 Zellklone, die Ausgangszelllinie CAL51 und die Epithelzelllinie MCF-10A. Die Fehlerbalken ergeben sich aus drei unabhängigen Experimenten. Balken: 10 μm

Nach 30 Minuten sind schon Unterschiede im Absetzverhalten zu erkennen, die nach 60 Minuten deutlicher hervortreten. Von der Epithelzelllinie MCF-10A haben sich nach 60 Minuten fast 90% der Zellen abgesetzt, während sich von den CAL51 Zellen und der Negativ-Kontrolle erst ca. 55% abgesetzt und ausgebreitet haben. Die Restauration des Profilinspiegels mit Wildtyp Profilin verbessert das Absetzverhalten deutlich. Dies zeigt, dass sich die malignen Zellen wie erwartet langsamer absetzen als die Epithelzelllinie.

Bei den CAL51 Klonen, welche die PIP₂- oder Poly-Prolin-Bindungsmutante Profilins exprimieren, haben sich zum gleichen Zeitpunkt ähnlich wie bei MCF-10A Zellen schon 70 bis 90% der Zellen abgesetzt und ausgebreitet. Hingegen führt die Expression der Aktin-Bindungsmutante Profilins in CAL51 Zellen dazu, dass sich weniger als die Hälfte der Zellen abgesetzt und ausgebreitet haben.

Es wird auch in diesem Versuch deutlich, dass die tumorigenen Eigenschaften der CAL51 Zellen durch die Anhebung des zellulären Profilinsgehalts mit Mutanten, die ein gestörtes Bindungsverhalten für PIP₂ oder Poly-Prolin-Liganden aufweisen, supprimiert werden. Die Expression der Aktin-Bindungsmutante Profilins bewirkt keine Modulation des Absetzverhaltens im Vergleich zur Ausgangszelllinie CAL51.

3.6 Differenzierung im Matrigel

Normale Zellen differenzieren stark und bilden Strukturen aus, während Krebszellen diese Fähigkeit verloren haben. Das Wachstum von Zellen in Matrigel, eine der extrazellulären Matrix ähnlichen Substanz, ermöglicht es aufgrund des Differenzierungsgrades normale Zellen von Krebszellen zu unterscheiden.

In dieser Arbeit wurde ein modifiziertes Protokoll verwendet, in dem die Zellen nicht in das Matrigel eingebettet wurden, sondern auf einer Matrigel-Schicht wuchsen. Diese Methode wird auch benutzt, um *in vitro* transformierte Zellen von normalen Zellen zu unterscheiden (White et al., 1990). Der Vorteil des abgewandelten Protokolls ist eine frühzeitige Auswertung nach ca. 48 Stunden, während man die Differenzierung von eingebetteten Zellen erst nach ca. 10 Tagen dokumentieren kann. Es wurden 5×10^4 Zellen auf eine Matrigel-Schicht in 4-Loch-Platten ausgesät und der Differenzierungsgrad der Zellen nach 72 Stunden photographisch dokumentiert. Als Positivkontrolle wurde die Brustepithelzelllinie MCF-10A in diesem Versuch eingesetzt.

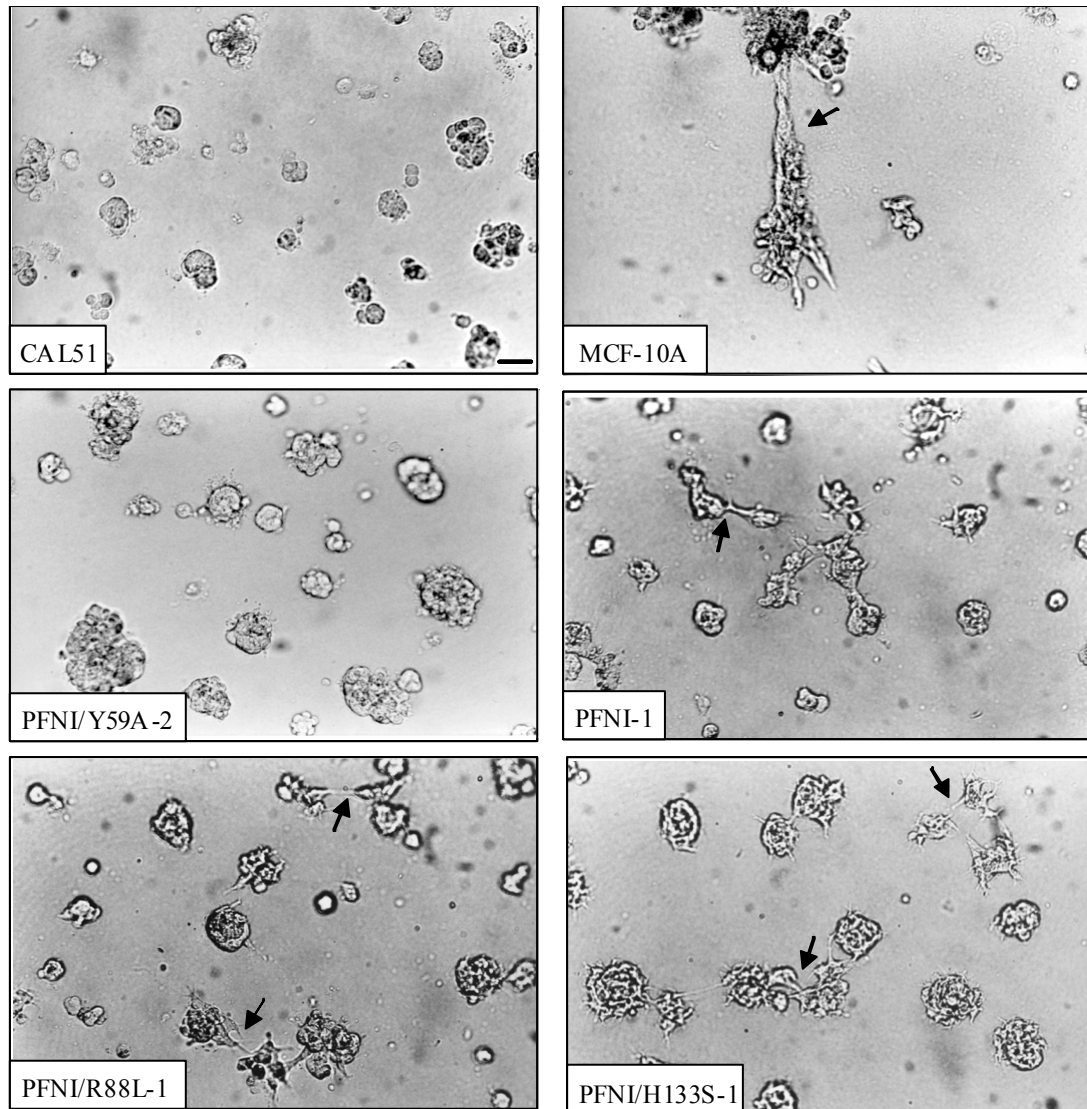


Abb.17: Wachstum und Differenzierung auf Matrigel

CAL51 Zellen und Zellen der stabil transfizierten CAL51 Klone wurden auf eine Matrigel-Schicht ausgesät und bei 37°C, 10 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach 72 Stunden Inkubation wurde das Wachstum und die Differenzierung der Zellen photographisch dokumentiert. Als Positivkontrolle wurde die Epithelzelllinie MCF-10A (schon nach 48 Stunden ausgewertet) verwendet. Die ausgebildeten, röhrenartige Strukturen sind durch schwarze Pfeile gekennzeichnet. Balken: 100 µm.

Die morphologischen Unterschiede zwischen der Brustkrebszelllinie CAL51 und der untransformierten Brustepithelzelllinie MCF-10A sind in Abbildung 17 deutlich zu erkennen. CAL51 Zellen teilen sich und bilden Zellaggregate, die als runde Kolonien vorliegen. Im Gegensatz dazu zeigen MCF-10A Zellen röhren-ähnliche Ausläufer in alle Richtungen und teilweise auch als Verbindungen zu anderen Zellen. Diese Ausläufer weisen Ähnlichkeiten zu drüsigen Strukturen, wie es für Brustepithelgewebe typisch ist, auf. CAL51 Zellen, deren Profilinspiegel mit Wildtyp Profilin I, der Poly-Prolin-Bindungsmutante oder der PIP₂-

Bindungsmutante Profilins erhöht wurden, zeigen ähnliche morphologische Veränderungen wie MCF-10A Zellen. Es sind längliche Ausläufer zuerkennen, die durch Pfeile in Abbildung 17 hervorgehoben sind. Zellen, deren Profilinspiegel durch die Aktin-Bindungsmutante von Profilin erhöht wurde, bilden keine derartigen Strukturen sondern Zellaggregate wie die Krebszelllinie. Im Vergleich zur MCF-10A Zelllinie waren die Ausläufer der CAL51 Zellklone kleiner, was die generellen Unterschiede der beiden verwendeten Zelllinien in diesem Versuch widerspiegeln könnte.

Auch aus diesem Versuch lässt sich schließen, dass die Anhebung des Profilinspiegels in CAL51 Zellen mit einer Profilinmutante, die nicht mehr mit Aktin interagieren kann, nicht zu einer Suppression des tumorigenen Phänotyps führt. Dieses Resultat untermauert die Ergebnisse aus dem Weichagar- und dem „Spreading“-Versuch, bei denen die Expression der Aktin-Bindungsmutante Profilins keine Suppression der Tumorigenizität bewirkte.

3.7 Tumorigenizität in Nacktmäusen

Bei der Untersuchung von Tumorsuppressorgenen ergibt sich immer die Schwierigkeit transformierte Zellen oder Krebszellen von normal wachsenden Zellen *in vitro* zu unterscheiden. Wachstumskurven, Wachstum in Weichagar oder Matrigel sind Methoden um erste Hinweise über das tumorigene Potential von Zellen *in vitro* zu gewinnen. Die endgültige Aussage, ob Zellen ein tumorigenes Potential besitzen, kann man nur durch Versuche mit Nacktmäusen erzielen. Die Nacktmaus ist durch einen angeborenen Thymusverlust charakterisiert (Pantelouris, 1968), so dass ihr sämtliche immunologische Funktionen, die vom Thymus abhängig sind, fehlen (Rygaard, 1969). Aufgrund des supprimierten Immunsystems dieser Mäuse können Transplantationen vorgenommen werden (Povlsen et al., 1973) oder maligne Zellen injiziert werden, welche dann einen Tumor in relativ kurzer Zeit ausbilden (Giovanella et al., 1974). Dies ist ein eindeutiger *in vivo*-Beweis, dass es sich um Zellen handelt, die ein krebsartiges Potential besitzen.

Der Versuch wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. S. Scherneck (Max-Delbrück-Zentrum, Berlin-Buch) und Dr. W. Arnold (atugen AG, Berlin-Buch) durchgeführt. In diesem Versuch wurden 5 bis 6 Wochen alte weibliche Mäuse mit der Stammbezeichnung NMRI-nu/nu verwendet. Pro Versuchsansatz wurden 1×10^5 bzw. 1×10^6 Zellen in 0,1 ml Medium subkutan in die linke Bauchhälfte injiziert. Die Injektion der geringeren Zellzahl verstärkt die Aussage über das tumorigene Potential von Zellen, wenn durch die Injektion der

geringeren Zellzahl eine Tumorbildung ausgelöst wird. Das Wachstum und die Größe der Tumoren wurde wöchentlich dokumentiert und der Versuch nach 11 Wochen beendet. Mäuse, deren Gesundheitszustand stark beeinträchtigt war, wurden schon vor Ablauf des Versuches getötet. Von den CAL51 Zellklonen, die die Profilinmutanten stabil exprimieren wurden pro Mutante zwei Klone für diesen Versuch verwendet. Als Kontrolle dienten CAL51 Zellen, welche mit dem leeren pcDNA3-Vektor transfiziert wurden.

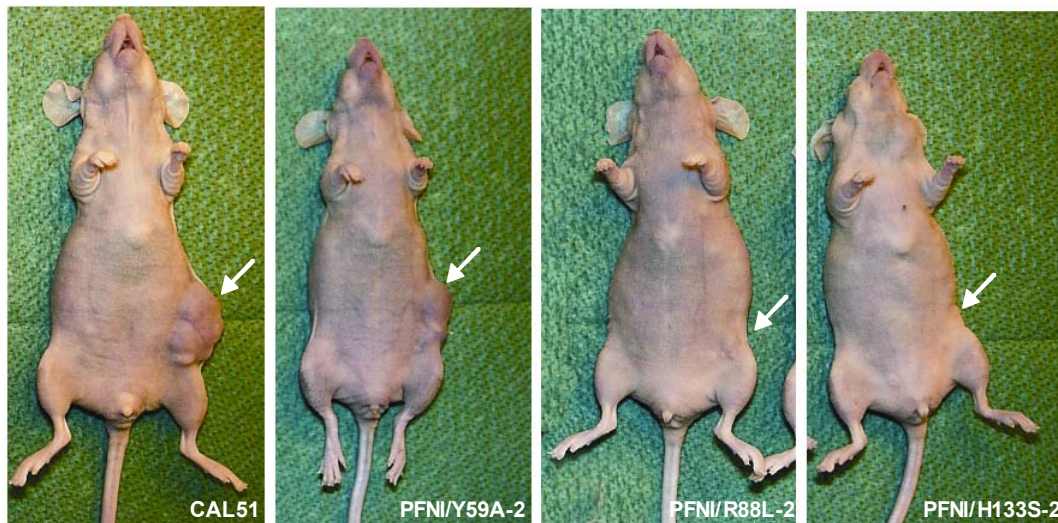


Abb.18: Tumorbildung in Nacktmäusen

Die Abbildung zeigt die während des Versuches entwickelten Tumoren nach 11 Wochen Versuchsdauer. Die Injektion der Zellen erfolgte subkutan in die linke Bauchhälfte (Pfeil), wo der entstandene Tumor zu erkennen ist. Die Krebszelllinie CAL51 und die Zellen, welche die Aktin-Bindungsmutante des Profilins (PFNI/Y59A) exprimieren, entwickeln starke Tumoren, während die Zellen mit der Poly-Prolin-Bindungsmutante des Profilins (PFNI/H133S) keinen Tumor hervorrufen und die Expression der PIP₂-Bindungsmutante Profilins (PFNI/R88L) in CAL51 nur einen relativ kleinen Tumor verursacht.

11 Wochen nach Injektion der zu untersuchenden CAL51 Zellen wurden Aufnahmen von den Mäusen gemacht (Abb.18). Es sind die in den Mäusen auf der linken Bauchseite entwickelten Tumoren deutlich zu erkennen. Nach Injektion der PFNI/H133S-exprimierenden Zellen ist kein Tumor von außen zu erkennen.

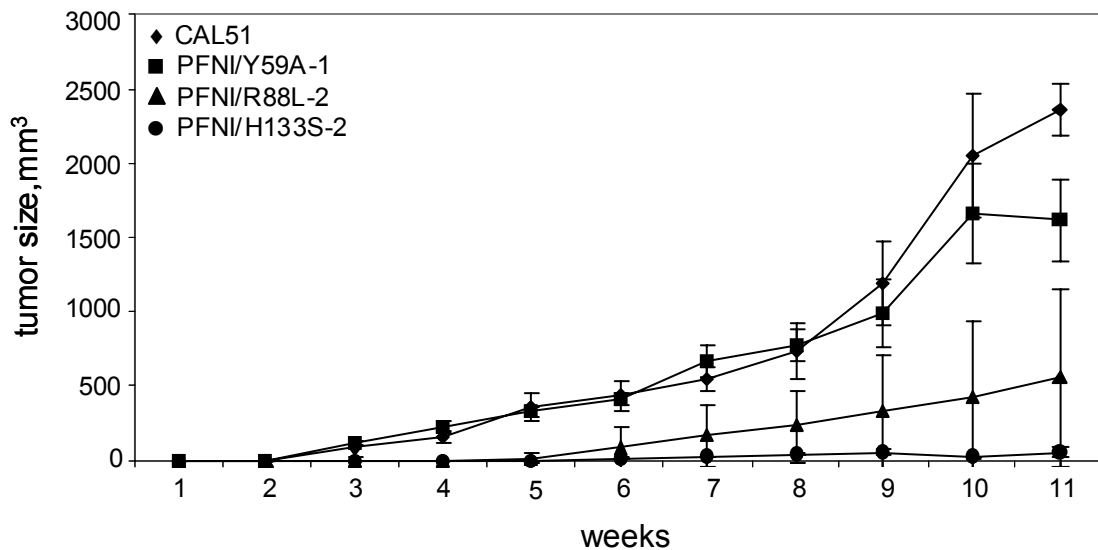


Abb.19: Verlauf des Tumorwachstums während des 11-wöchigen Versuchs

Das Diagramm zeigt das zunehmende Tumolvolumen in Abhängigkeit von der Zeit. Die Mäuse wurden zum Zeitpunkt 0 mit den CAL51 Kontrollzellen und den PFNI/Y59A-, PFNI/H133S- oder den PFNI/R88L-exprimierenden Zellen injiziert. Nach einer Woche wurde mit der Messung des Tumorwachstums begonnen. Der Durchmesser des Tumors wurde gemessen und anschließend das Volumen berechnet. Pro Zelllinie wurden zwei unterschiedliche Zellzahlen injiziert und pro Zellzahl drei Mäuse verwendet. Die Fehlerbalken ergeben sich aus den drei Mäusen, die pro Profilinmutante mit Zellen injiziert wurden.

Die Injektion von CAL51 Kontrollzellen löste bei allen injizierten Mäusen (6 Mäuse) Tumoren aus, die nach elf Wochen Versuchsdauer ein Volumen von bis zu 2300 mm³ erreicht hatten (Abb.19). Auch die Injektion von 10⁵ CAL51 Kontrollzellen löste die Bildung eines Tumors in den Mäusen aus, was das tumorigene Potential dieser Zellen unterstreicht. Die, in Zusammenarbeit mit uns erstellte, frühere Studie von Prof. Dr. S. Scherneck dokumentierte ein vergleichbares Tumorwachstum nach Injektion von CAL51 Zellen. Die Studie zeigte, dass die Restauration des Profilinspiegels in den CAL51 Zellen mit Profilin I dazu führte, dass keine bzw. mit einem Volumen von 147 mm³ nur sehr kleine Tumoren in der Maus entstanden (Janke et al., 2000).

In diesem Versuch wurden von jeder Profilinmutante zwei verschiedene CAL51 Zellklone eingesetzt, damit zufällige Ergebnisse ausgeschlossen werden konnten. Beide Zellklone, die die Poly-Prolin-Bindungsmutante von Profilin exprimieren, erzeugten entweder keine oder nur winzige Tumoren, die am Ende des Versuchs ein Volumen von maximal 60 mm³ aufwiesen (Abb.19). Im Vergleich zu unserer früheren Studie lässt sich festhalten, dass die Anhebung des Profilinspiegels mit einer Mutante, die in ihrer Affinität für Poly-Prolin-

Liganden gestört ist, zur vollständigen Suppression der Tumorigenizität in Nacktmäusen führt. Nach Injektion der kleineren Zellzahl trat bei allen Mäusen kein Tumor auf, was das nicht-krebsartige Potential dieser Zellen noch unterstreicht.

Klone, die die PIP₂-Bindungsmutante von Profilin exprimieren, bildeten kleine Tumoren (Volumen: 500 mm³) und die Injektion von 10⁵ Zellen beider PFNI/R88L-exprimierenden Klone führte nur bei zwei von drei Mäusen zu einem Tumor (Tab. III.2) mit einem Volumen bis zu 237 mm³. Dies entspricht Größenordnungen, die in unserer früheren Studie als vollständige Suppression der krebserartigen Eigenschaften gewertet wurden. Man kann in diesem Fall von einer starken aber nicht vollständigen Unterdrückung des krebserartigen Phänotyps sprechen.

Tab. III.2: Tumorigenizität der CAL51 Zellklone,
die Profilinmutanten exprimieren

Cell line	Inoculated cells per animal	Mice with tumor/mice injected	Tumor size (mm ³) after 11 weeks
CAL51*	10 ⁶	4/4	918
	10 ⁵	4/4	746
CAL/P-25*	10 ⁶	2/5	62
	10 ⁵	0/3	-
CAL51	10 ⁶	3/3	2364
	10 ⁵	3/3	385
PFNI/Y59A-1	10 ⁶	3/3	1611
	10 ⁵	3/3	440
PFNI/Y59A-2	10 ⁶	3/3	1017
	10 ⁵	2/3	18
PFNI/R88L-1	10 ⁶	3/3	413
	10 ⁵	2/3	73
PFNI/R88L-2	10 ⁶	3/3	557
	10 ⁵	2/3	237
PFNI/H133S-1	10 ⁶	3/3	45
	10 ⁵	0/3	-
PFNI/H133S-2	10 ⁶	3/3	60
	10 ⁵	0/3	-

*Data from Janke et al., 2000

CAL51 Zellklone, die die Aktin-Bindungsmutante von Profilin exprimieren, bildeten in fast allen Mäusen (PFNI/Y59A-1: 6 Mäuse; PFNI/Y59A-2: 5 Mäuse) Tumoren mit einem Endvolumen bis zu 1611 mm³. Auch die Injektion von 10⁵ Zellen führte zur Tumorbildung in den Mäusen mit im Durchschnitt größeren Tumoren als bei CAL51 Zellen (Tab.III.2). Diese

Zellen besitzen also weiterhin ein tumorigenes Potential, was übereinstimmend mit den Ergebnissen aus dem „Spreading“- ,dem Weichagar- und dem Matrigel-Versuch ist.

Anhand dieses Versuchs konnten die *in vitro* ermittelten Ergebnisse aus den Wachstumskurven, dem Weichagar- und dem Matrigel-Versuchen *in vivo* bestätigt werden. Die Expression der Profilinmutante, welche nicht mehr mit Aktin interagiert, führt nicht zur Suppression der Tumorigenizität in der Brustkrebszelllinie CAL51. Um sicherzustellen, dass es sich tatsächlich um Tumorzellen handelt, die in den Mäusen tumor-ähnliche Geschwülste verursachen, wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. S. Scherneck histologische Schnitte vom Tumorgewebe angefertigt und von einem Pathologen begutachtet.

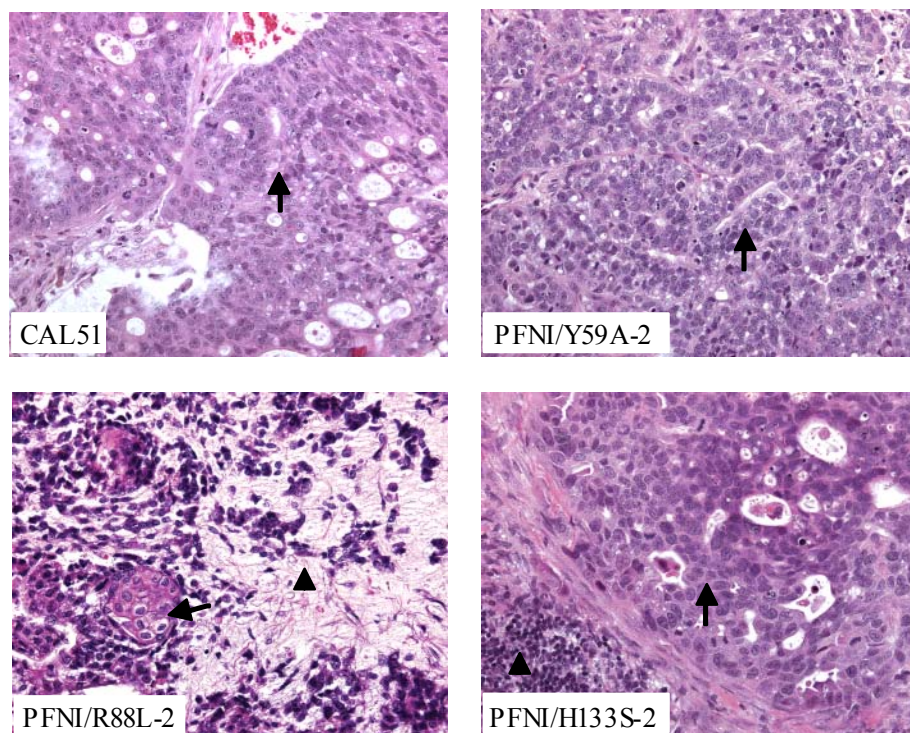


Abb.20: Histologie der Maustumoren

Die aus den Mäusen entnommenen Tumoren wurden mit Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet und anschließend 5 µm dicke Schnitte erstellt. Die Schnitte wurden Hematoxylin und Eosin gefärbt, um unterschiedliche Zellpopulationen sichtbar zu machen und die Bilder wurden mit 200-facher Vergrößerung aufgenommen. Bereiche mit malignen Zellen sind durch schwarze Pfeile und Bereiche mit normalen Zellen sind durch „arrow heads“ gekennzeichnet. Die histologischen Schnitte und Aufnahmen wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. S. Scherneck erstellt.

In Abbildung (Abb.20) sind histologische Schnitte der entnommenen Tumoren gezeigt, die in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. S. Scherneck erstellt wurde. Die Tumoren wurden mit Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet und anschließend wurden 5 µm dicke Schnitte hergestellt. Die Anfärbung der Gewebeschnitte erfolgte mit Hematoxylin und Eosin.

Die Auswertung der Histologie der Gewebeschnitte ergab, dass alle entstandenen Geschwülsten auch krebsartige Charakteristika aufweisen. So bestehen auch die kleinen, von den CAL51 Klonen, die die Poly-Prolin-Bindungsmutante von Profilin exprimieren, hervorgerufenen Geschwülste aus malignen Zellen. Folglich konnte die Aussage bestätigt werden, dass tatsächlich in allen Fällen Tumoren durch die Injektion der Zellen entstanden sind.

Als Nächstes sollte festgestellt werden, ob die Expression der Profilinmutanten in den Tumoren nachweisbar ist

3.8 Nachweis der Profilinexpression in den Tumoren

Mit den vorhergegangenen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass die manipulierten CAL51 Zellen in den Mäusen Tumoren gebildet haben. Es sollte als Nächstes ausgeschlossen werden, dass die Tumoren nicht durch den Verlust der stabil transfizierten Konstrukte ausgelöst wurden. Es ist bekannt, dass stabil transfizierte Zellen die integrierten Konstrukte aus ihrem Genom herauschneiden können oder dass die Expression der Proteine aufgrund zunehmender DNA-Methylierung eingestellt wird, wenn man die Zellen über längere Zeiträume kultiviert. Der Verlust des transfizierten Profilins führt zur Abnahme des Profilinspiegels in den Zellen, was die Bildung von Tumoren auslösen könnte.

Es wurden Zellextrakte aus dem entnommenen Tumorgewebe hergestellt (unter II.2.4.7 beschrieben). Nach Auftrennung der Zellextrakte in der SDS-PAGE wurden per Immunblot mit dem anti-BiPro-Antikörper 4A6 die Profilinmutanten nachgewiesen. Der endogene und der rekombinante Profilinanteil wurde durch quantitative Immunblots in den Tumorgeweben bestimmt. Hierbei wurde der Gesamtproteingehalt auf den Tubulingehalt in den Zellextrakten abgeglichen.

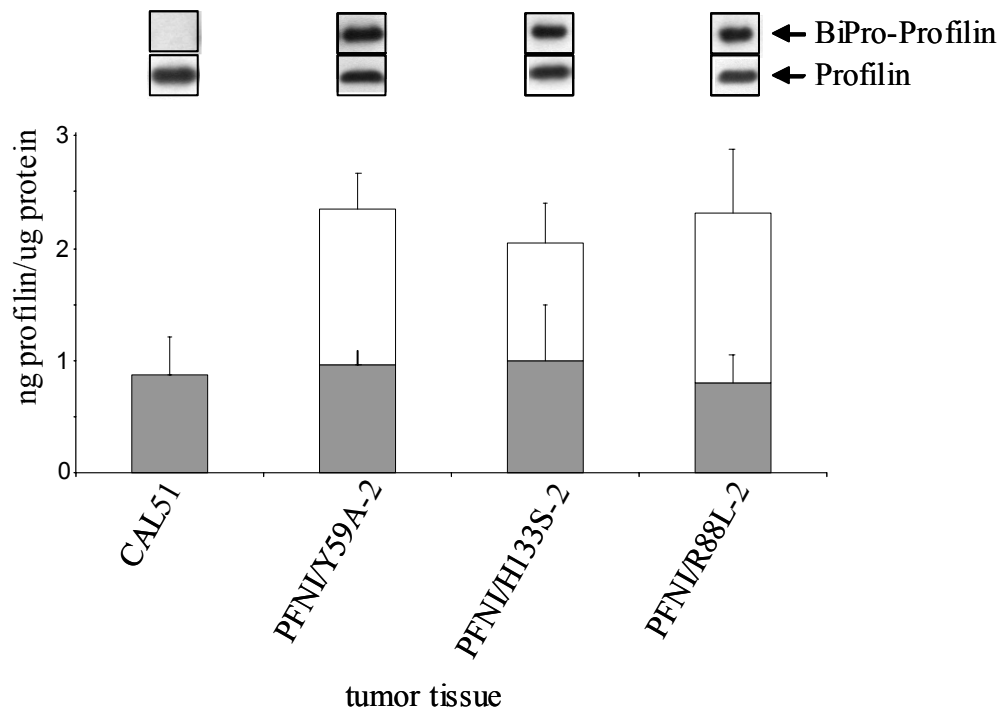


Abb.21: Profilinexpression in den Maustumoren

Gewebeextrakte aus den entnommenen Maustumoren wurden auf ihre Profilinexpression hin untersucht. Gewebeextrakte wurde wie unter II.2.3.7 beschrieben hergestellt, in der SDS-PAGE aufgetrennt und geblottet. Der Nachweis des endogenen Profilins erfolgte mit dem monoklonalen anti-Profilin-Antikörper 2H11 und der rekombinante Profilinanteil wurde mit dem monoklonalen anti-BiPro-Antikörper 4A6 nachgewiesen. Für die quantitative Analyse der Expressionsspiegel wurde ein Profilin-Standard mit rekombantem Protein aufgetragen. Eine Eichgerade wurde erstellt und über die Geradengleichung konnten die Expressionsstärken berechnet werden (nicht gezeigt). Abbildung 21 zeigt die Auswertung der Profilinexpression in den Zellextrakten als Diagramm. Die grauen Balken dokumentieren den endogenen Profilinspiegel und die weißen Balken stellen den rekombinanten Profilinanteil dar. Die Standardabweichung ergibt sich aus 3 bis 5 ermittelten Werten, da das Gewebe in nur begrenztem Maße zur Verfügung stand.

Abbildung 21 zeigt die endogene und rekombinante Profilinexpression in Tumorgeweben, welche im Immunblot ermittelt wurde. Die Profilinanteile wurden, wie in Abbildung 9 gezeigt, quantifiziert. Es ist ersichtlich, dass in allen untersuchten Tumoren die entsprechenden Profilinmutanten exprimiert wurden und es nicht zum Verlust der transfizierten cDNAs gekommen ist.

Aufgrund der quantitativen Auswertung wird deutlich, dass die Profilinmutanten, mit 1,1 bis 1,4 ng BiPro-markiertem Profilin, vergleichbar stark exprimiert wurden. Die endogene Profilinexpression hat sich durch die Überexpression der Profilinmutanten, im Vergleich zu dem durch CAL51 Zellen hervorgerufenen Tumor, nicht verändert. Die entstandenen Effekte in der Maus können folglich miteinander verglichen werden und sind auf die Expression der Mutanten zurückzuführen.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Anhebung des Profilinspiegels in der Brustkrebszelllinie CAL51 durch die stabile Expression von Profilinbindungsmutanten, die nicht mehr mit PIP₂ oder Poly-Prolin-Liganden interagieren können, zu einer Suppression der Tumorigenizität führt. Dies konnte in zahlreichen *in vitro* Versuchen demonstriert werden. Auch nach Injektion der betreffenden Zellen in Nacktmäuse wurde kein Tumor generiert bzw. bei PFNI/R88L-exprimierenden Zellen bildeten sich sehr kleine Tumoren.

Wird der Profilinspiegel hingegen mit einer Profilinmutante, welche eine reduzierte Aktin-Bindungsfähigkeit hat, angehoben, so verhalten sich die CAL51 Zellen weiterhin tumorigen. Diese Zellen konnten weiterhin verankerungsunabhängig in Weichagar wachsen, sie zeigten eine reduzierte Fähigkeit Zell-Matrix-Kontakte auszubilden und konnten nach Kultivierung auf Matrigel nicht differenzieren. Darüber hinaus hatten diese Zellen in der Nacktmaus ein starkes tumorigenes Potential und entwickelten in allen Mäusen große Tumoren.

Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass eine intakte Aktin-Bindungsstelle am Profilinmolekül für die Tumorsuppressorfunktion von Profilin in Epithelzellen gegeben sein muss.

IV. Diskussion

Transformierte Zellen und Krebszellen unterscheiden sich von normalen Zellen durch verschiedene Parameter. Sie haben eine erhöhte Proliferationsrate und sind nicht kontakthinhibiert. Außerdem zeigen Zellen mit einem tumorigenen Phänotyp verankerungsunabhängiges Wachstum, den Verlust von Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Kontakten und Veränderungen im Organisationsgrad des Mikrofilamentsystems. Es treten häufig Veränderungen in zellulären Prozessen auf, die auf der Dynamik des Mikrofilamentsystems basieren (Pawlak and Helfman, 2001). Damit korreliert der Befund, dass viele Cytoskelett-Proteine Tumorsuppressor-Proteine sind, die einen geringeren Expressionsspiegel in Krebszellen im Vergleich zu normalen Zellen aufweisen (Ben-Ze'ev, 1997). In Brustkrebszelllinien und Brustkrebsgewebe sind reduzierte Expressionsspiegel von Profilin festgestellt worden und die Restauration des Profilinspiegels mit rekombinantem Profilin I führte zur Suppression der Tumorigenizität in der Brustkrebszelllinie CAL51 (Janke et al., 2000). Folglich besitzt Profilin I eine Tumorsuppressoraktivität und reduzierte Profilinspiegel führen zu einem transformierten, tumorigenen Phänotyp in Zellen. Darüber hinaus ist der vollständige Verlust von Profilin I letal für embryonale Zellen (Witke et al., 2001).

Die Mechanismen für die reduzierte Expression von Profilin in Brustkrebszellen sind zur Zeit nicht bekannt. Häufig sind Mutationen oder Deletionen im codierenden Bereich von Tumorsuppressorgen die Ursache für eine Reduktion der Expression, wie bei dem prominenten Tumorsuppressor p53 (Levine et al., 1991). Im Fall von Profilin sind keine Mutationen im kodierenden Bereich gefunden worden, die zu einem Aminosäureaustausch geführt hätten. Es ist lediglich eine Mutation im 5'-untranslatierten Bereich, möglicherweise in der Promotorregion, identifiziert worden (Janke et al., 2000). Es wäre denkbar, dass diese Mutation das Bindungsverhalten von Transkriptionsfaktoren negativ beeinflussen könnte, was zur Reduktion der Transkription und damit auch zur Reduktion der Expression führen könnte. Die Expression des Zell-Zell-Kontakt-Proteins E-Cadherin wird beispielsweise von dem Transkriptionsfaktor Snail reprimiert, wobei die Bindungsregion für Snail innerhalb der Promotorregion vom E-Cadherin-Gen liegt (Batlle et al., 2000). Andere Mechanismen, wie z.B. ein zu hoher Methylierungsstatus der Promotorregion oder die Inaktivierung transkriptioneller Chromosomenbereiche durch posttranslationale Modifikationen von Histonen werden zur Zeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. S. Scherneck untersucht.

Welche der für Profilin postulierten Funktionen (siehe Einleitung) eine Rolle für die Tumorsuppression in Brustkrebszellen spielt, sollte im Rahmen dieser Arbeit detaillierter untersucht werden. Hierfür wurde der Profilinspiegel in der Brustkrebszelllinie CAL51 mit funktionellen Mutanten erhöht. Es wurden Mutanten mit einer reduzierten Affinität für Aktin (Schluter et al., 1998), PIP₂ (Sohn et al., 1995) oder Poly-Prolin-Liganden (Bjorkegren et al., 1993) verwendet (siehe auch Tabelle I.1). Die biochemische Charakterisierung der hier verwendeten Profilinmutanten zeigte, dass die Mutationen zu einer starken Reduktion in der Bindung des jeweiligen Liganden führten. Für die Untersuchungen ist wichtig, dass die Interaktion der Mutanten mit den anderen Liganden Profilins nicht negativ beeinflusst wird. Aus Tabelle I.1 ist ersichtlich, dass alle verwendeten Mutanten nur in der Interaktion mit ihrem spezifischen Liganden stark geschwächt sind, sich im Übrigen aber wie natives Profilin vom Wildtyp verhalten.

Die stabil exprimierten Profileine tragen N-terminal das BiPro-Epitop tag (Rudiger et al., 1997), so dass im Immunblot der rekombinante und der endogene Profilinanteil quantifiziert werden konnte. Für die Quantifizierung über Eichkurven musste rekombinantes Profilin und BiPro-markiertes Profilin mittels Affinitätschromatographie an einer Poly-Prolin-Säule aufgereinigt werden (Tanaka and Shibata, 1985). Das Elutionsverhalten beider rekombinanter Proteine war nahezu identisch und zeigt, dass die Markierung des Profilins mit dem BiPro-Epitop-tag nicht die Bindung an Poly-Prolin beeinflusst. Der C- und N-Terminus des Profilins sind an der Bildung der Poly-Prolin-Bindungsstelle maßgeblich beteiligt (Mahoney et al., 1997; Metzler et al., 1994), so dass Störungen des Bindungsverhaltens durch Fusionsanteile hervorgerufen werden können (Lambrechts et al., 2002). So führte die Fusion von GFP an den C-Terminus von Profilin zu einer Störung der Interaktion mit Poly-L-Prolin (Wittenmayer et al., 2000), wobei zu berücksichtigen ist, dass es sich bei GFP um ein 27 kDa großes Protein handelt und die BiPro-Markierung nur 12 Aminosäuren umfasst. Eine Modulation der Interaktion mit Poly-Prolin-Liganden durch diese Markierung kann also ausgeschlossen werden.

Die Quantifizierung der Profilinanteile der stabil exprimierenden CAL51 Klone ergab, dass sich der endogene Profilinspiegel durch die konstitutive Expression des rekombinanten Profilins bei allen untersuchten Zellklonen nicht verändert hat. Durch die Integration des Plasmids in das Genom der Zellen können andere Gene deletiert werden oder „Silencer“- bzw. „Enhancer“-Elemente zerstört werden, was sich auch auf die Expression des endogenen Profilins auswirken könnte. Darüber hinaus könnte die Anhebung des Profilinspiegels durch

rekombinantes Profilin eine Regulation der endogenen Expression auslösen, falls Zellen über solche zellulären Rückkopplungsmechanismen verfügen sollten. Für andere Cytoskelettproteine (Schulze et al., 1989) sind Autoregulationsmechanismen beschrieben, wie beispielsweise die Suppression der endogenen α -Tubulinexpression durch die stabile Expression von α -Tubulin (Gonzalez-Garay and Cabral, 1996).

Aus der Quantifizierung ergibt sich für alle im Immunblot charakterisierten Klone ein Gesamtprofilingehalt, der dem 1,3 bis 1,6-fachem Profilingehalt der Krebszelllinie entspricht. Im Vergleich mit der Epithelzelllinie MCF-10A (Gesamtprofilingehalt: 1,44-fach im Vergleich zu CAL51) und dem CAL17.5 Zellklon (Gesamtprofilingehalt: 1,52-fach im Vergleich zu CAL51) erreichen die Zellklone einen Gesamtprofilingehalt, der mit dem Profilinspiegel von normalen Epithelzellen vergleichbar ist (Abb.10). Folglich konnten Effekte, die aufgrund einer zu starken Überexpression der Profilin hervorgerufen werden, ausgeschlossen werden. Die moderate Expression der Profilinmutanten in allen Zellklonen ermöglichte den Vergleich untereinander und mit MCF-10A Zellen in den weiteren Versuchen. Im Vergleich zur der von uns in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. S. Scherneck erstellten Studie ergeben sich allerdings Unterschiede in der Quantifizierung der Profilinexpressionen. In dieser Studie wurde eine 14-fache Überexpression in CAL17.5 Zellen und eine ca. 5-fache Überexpression für die Wildtyp Profilin-exprimierenden Zellklone berichtet. Im Gegensatz dazu hat die Quantifizierung des Profilingehalts der CAL17.5 Zellen in dieser Arbeit nur eine 1,5-fache Überexpression von Profilin ergeben. Zwei Ursachen sind für diese Diskrepanz möglicherweise verantwortlich: In dieser Arbeit wurde eine detaillierte Quantifizierung vorgenommen, sowie eine Normierung auf Tubulin zugrunde gelegt, während in der früheren Studie der Profilingehalt auf den Aktgehalt der Zellen normiert wurde. Folglich könnten sich die oben aufgeführten Unterschiede aufgrund der verschiedenen biochemischen Methoden ergeben. Andererseits ist es möglich, dass die damals verwendeten CAL17.5 Zellen durch den hohen Profilingehalt instabil waren und nach weiteren Passagen nur Zellen mit dem hier festgestellten Profilingehalt überlebten. Es bleibt festzuhalten, dass der Profilingehalt für die hier verwendeten Klone mindestens über den Zeitraum der hier präsentierten Untersuchungen (mehrere Monate) stabil blieb.

Auffällig ist trotzdem, dass keine Zellklone mit drastisch hohen Expressionsraten isoliert wurden. Das Expressionsplasmid trägt den Cytomegalovirus-Promotor (CMV), der durchaus zu den stark exprimierenden Promotoren gehört (Boshart et al., 1985). Profilin wird in jeder Zelle des Organismus exprimiert und es ist mit Konzentrationen von 20 bis 40 μ M in HeLa-Zellen oder 50 μ M in humanen Thrombozyten in hohen Mengen vorhanden (Machesky et al.,

1993). Möglicherweise gibt es zelltyp-spezifische Unterschiede in Bezug auf die Toleranz gegenüber dem Profilingehalt. Stabil transfizierte Zellen können die Fremd-DNA wieder aus ihrem Genom herausschneiden und damit wird das Fremdprotein nicht mehr exprimiert. Die Kultivierung von stabil transfizierten Zellen in Medium mit geringem Selektionsdruck, soll diesem Ereignis entgegenwirken, ist aber nicht immer erfolgreich. Darüber hinaus wird auch die integrierte DNA von eukaryontischen Zellen methyliert und dies kann ebenfalls eine Ursache für abnehmende Expressionsstärken bei stabil transfizierten Zellen sein. Andere Cytoskelettproteine mit Tumorsuppressoraktivität, wie z.B. Vinculin zeigen nach stabiler Transfektion in den entsprechenden Zellklonen eine maximal vierfache Expression (Rodriguez Fernandez et al., 1992).

Im Rahmen der Diplomarbeit von Julia Ritz wurde in unserer Arbeitsgruppe die Expression von weiteren Proteinen in den CAL51 Zellklonen untersucht. Die Erhöhung der Profilinexpression resultiert nicht in einer Veränderung der Expressionsraten von Profilinliganden, wie Aktin, SMN, Gephyrin oder VASP. Möglicherweise hätte sich die Überexpression von Profilin regulierend auf die Expression von Profilinliganden auswirken können. Übereinstimmend damit hat eine frühere Studie mit Virus-vermittelter transients Überexpression von Profilin in Endothelzellen gezeigt, dass sich der Expressionsspiegel des Aktins nicht verändert hat (Moldovan et al., 1997). Auch die Reduzierung der Profilinexpression mittels der RNAi-Technologie (Hammond et al., 2001) zeigte bisher, dass die Expression von Proteinen wie Aktin, Vinculin, Metavinculin oder „myosin heavy chain“ nicht beeinflusst wurden (Tang and Tan, 2003).

Es sind keine morphologische Veränderungen bei den CAL51 Transfektanten aufgetreten, wie es bei anderen Cytoskelettproteinen, die als Tumorsuppressor fungieren, berichtet wurde. Die Transfektion und Expression von Tropomyosin I in der Brustkrebszelllinie MCF-7 führt zu einem epithelialen Phänotyp und Wachstum der Zellen in festeren zusammenhängenden Gruppen (Mahadev et al., 2002). Ähnliche Phänomene konnten bei den CAL51 Transfektanten nicht beobachtet werden.

Zusätzlich hat die Darstellung des Aktin-Cytoskeletts mit Fluoreszenz ergeben, dass keine Veränderungen in der Organisation des Aktin-Cytoskelett durch die stabile Expression der Profilinmutanten aufgetreten sind. Dies steht im Widerspruch zur unserer früheren Studie (Janke et al., 2000), bei der die Überexpression von Profilin I zu einer stärkeren Organisation des Aktin-Cytoskeletts in den Transfektanten führte und mit einem normalen Phänotyp von Zellen korreliert. Auch diese scheinbare Diskrepanz lässt sich auf die unterschiedliche

Profilinexpression zurückführen. Vermutlich reicht eine derart niedrige Expression von Profilin nicht aus, um einen prominenten Effekt auf die Organisation des Cytoskeletts zu verursachen.

Einige Klone, die über längere Zeiträume kultiviert wurden, zeigten eine Reduktion der Expression der BiPro-markierten Profilinmutanten. Dies ist auch für andere stabil transfizierte Gene beschrieben (Gluck et al., 1993; Rodriguez Fernandez et al., 1992).

Krebszellen unterscheiden sich von normalen Zellen durch unkontrolliertes Wachstum und zeigen eine erhöhte Proliferationsrate. In unserer früheren Studie führte die Restauration des Profilinspiegels in CAL51 mit Wildtyp Profilin I zu einer starken Reduktion der Proliferationsrate, was mit einem normalen Phänotyp von Zellen korreliert (Janke et al., 2000). Auch die Expression der Profilinmutanten, die eine verringerte Affinität für PIP₂ oder Poly-Prolin-Liganden haben, führte zu einer Reduktion der Proliferationsrate in CAL51 Zellen. Die Restauration des Profilin Gehalts mit der Aktin-Bindungsmutante des Profilins hingegen ergab eine moderate Reduktion der Proliferation, was als erster Hinweis auf Unterschiede im Vergleich der Mutanten in der Tumorsuppression gewertet wurde. Zusätzlich zeigte die Vektor-transfizierte Zelllinie eine leichte Wachstumshemmung, was mit der Integration des Vektors in das Genom der Zellen begründet werden muss. Die Integration des Vektors ist zufällig und kann für das Wachstum der Zellen wichtige Gene zerstören. In der Regel wird eine Vektor-Kontrolle mitgeführt, um zu demonstrieren, dass das zusätzlich exprimierte Protein und nicht die Integration des Vektors für eine Veränderung der Proliferation verantwortlich ist. In unserer früheren Studie wurden CAL51 Zellen ebenfalls mit dem leeren pcDNA3-Vektor transfiziert und das Wachstum war auch dort minimal reduziert (Janke et al., 2000). Andere Studien haben gezeigt, dass die Transfektion der Zellen mit Kontrollvektoren keinen Einfluss auf das Wachstum hat (Honjo et al., 2001; Mahadev et al., 2002). Ferner benutzen viele Arbeitsgruppen als Kontrolle GFP-stabil-exprimierende Zellen, um zu demonstrieren, dass die ermittelten Effekte von dem jeweiligen untersuchten Protein abhängen und nicht durch die zusätzliche Expression eines zellunabhängigen Proteins hervorgerufen werden (z.B. GFP) (Marzesco et al., 2002).

Die Adhäsion von Zellen an die extrazelluläre Matrix und an benachbarte Zellen spielt eine große Rolle für komplexe biologische Abläufe, wie Motilität, Wachstum, Differenzierung und das Überleben von Zellen. Die Metastasierung von Krebszellen setzt voraus, dass Kontakte zu Nachbarzellen zerstört werden, Krebszellen in Blutgefäße einwandern und an entfernten Orten in anderes Gewebe eindringen, sich anheften und einen Sekundärtumor bilden. Diese Prozesse beinhalten den Aufbau und Abbau von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten. Ein

Charakteristikum von tumorigenen Zellen ist die Abnahme der Adhäsionsfähigkeit an das Substrat oder an Nachbarzellen, was mit veränderten Expressionsstärken von Integrinen, Cadherinen und auch Cytoskelettproteinen einhergeht (Ben-Ze'ev, 1997; Parish et al., 1987). Der „Spreading“-Versuch hat gezeigt, dass die Restauration des Profilinspiegels in CAL51 Zellen mit der Profilinmutante, die eine reduzierte Affinität für Aktin hat, zu keiner Modulation des Absetzverhaltens führte, wobei die PIP₂-Bindungs- und die Poly-Prolin-Bindungs-Mutante von Profilin eine deutliche Verbesserung des Absetzverhaltens erzeugt haben. Dies war der erste Hinweis darauf, dass sich die Anhebung des Profilinspiegels mit Profilinmutanten unterschiedlich auf die Tumorsuppressoraktivität auswirkt. In einer früheren Studien wurde demonstriert, dass durch eine Überexpression von Profilin in Endothelzellen eine stärkere Adhäsion der Zellen an das Fibronectin-beschichtete Substrat erfolgte (Moldovan et al., 1997). Zusätzlich wurde eine Zunahme der Integrindichte in den Profilin-überexprimierenden Zellen gemessen. Integrine sind Transmembranproteine, welche den Kontakt zwischen der extrazellulären Matrix und Multiproteinkomplexen auf der cytosolischen Seite vermitteln. Nach Bindung eines extrazellulären Liganden, wie Fibronectin, wird intrazellulär die Bildung eines Proteinkomplexes induziert, dessen Hauptkomponenten Proteine wie Talin, α -Actinin oder VASP sind (Knezevic et al., 1996; Reinhard et al., 1995b). Diese Proteine wiederum vermitteln die Interaktion mit Aktinfilamenten des Zellkortex oder von Stressfasern, wobei VASP auch die Rekrutierung von Profilin an die Fokalkontakte gewährleisten (Reinhard et al., 1995a) und Profilin die Aktinpolymerisation beschleunigen könnte. Der Einfluss Profilins auf die Aktinpolymerisation scheint bei der Bildung von Fokalkontakten eine große Rolle für normale Zellen zu spielen, da die Aktin-Bindungsmutante von Profilin das „Spreading“ der Krebszellen nicht verbessert. Dagegen ist die Rekrutierung von exogenem Profilin durch VASP an die Fokalkontakte offenbar nicht unbedingt notwendig, da die Expression der Poly-Prolin-Bindungsmutante des Profilins, die vermutlich kein VASP mehr binden kann, zu einer Verbesserung des „Spreadings“ in CAL51 Zellen führt.

Zwei weitere Untersuchungen, die *in vitro* Aufschluss über die Funktion Profilins in der Tumorsuppression geben sollten, stellten das Wachstum der Zellen in Weichagar und auf Matrigel dar. Ein wichtiges Kriterium für die Tumorigenizität von Zellen ist das verankerungsunabhängige Wachstum (Freedman and Shin, 1974; Shin et al., 1975). Diese Untersuchung wird für die Charakterisierung von Tumorsuppressor-Proteinen häufig verwendet (Gluck et al., 1993; Honjo et al., 2001; Janssen and Mier, 1997; Mahadev et al., 2002; Rodriguez Fernandez et al., 1992). Krebszellen bilden in Weichagar dreidimensionale

Zellaggregate, während normale Zellen auf die Verankerung am Untergrund angewiesen sind und ihre Proliferation in Weichagar einstellen. Die extrazelluläre Matrix reguliert das Wachstum und die Differenzierung von Epithelzellen *in vivo* und in Kultur (Blum et al., 1987; Wicha et al., 1982). Beispielsweise bewirken Substanzen, die der extrazellulären Matrix ähneln, die Induktion von spezifischen Genen in Brustepithelzellen, so dass Milchproteine (β -Casein) exprimiert werden und sich Strukturen ausbilden, die den Alveolen von Drüsengewebe ähneln (Aggeler et al., 1991; Streuli et al., 1991). Eines dieser extrazellulären Substanzen ist das Matrigel, welches aus einem Maussarcom (Engelbreth-Holm-Swarm) extrahiert wird und dessen Hauptbestandteile Wachstumsfaktoren, Kollagene, Laminin oder Proteoglykane sind (Kleinman et al., 1982). Brustepithelzellen, die in einer Matrigelschicht wachsen, werden stimuliert und bilden dreidimensionale röhrenartige Strukturen aus, die mit kleinen Milchgängen verglichen werden. Krebszellen haben diese Fähigkeit verloren, proliferieren zwar in dieser Umgebung, werden aber nicht zur Differenzierung angeregt und können so *in vitro* von normalen Epithelzellen unterschieden werden (Petersen et al., 1992). Unterschiede im Differenzierungsgrad zwischen normalen Zellen und Krebszellen treten schneller auf, wenn man die Zellen nur auf einer Matrigelschicht wachsen lässt, statt sie darin einzugießen (Boyd et al., 1990; Satyaswaroop and Tabibzadeh, 1991; White et al., 1990). Der Matrigel-Versuch und das Wachstum in Weichagar haben ergeben, dass die Anhebung des Profilinspiegels in CAL51 Zellen mit Profilinmutanten, die in ihrer Interaktion mit PIP₂ oder Poly-Prolin-Liganden geschwächt sind, zur Suppression der tumorigenen Eigenschaften führt. Die Zellen bleiben aber weiterhin undifferenziert und wachsen verankerungsunabhängig, wenn die Aktin-Bindungsmutante von Profilin exprimiert wird.

Hinsichtlich ihrer Tumorigenizität korrelieren die Ergebnisse, die im *in vivo* Modell der Nacktmaus erstellt wurden mit den Resultaten der anderen Versuche. Es zeigte sich lediglich, dass die Expression der PIP₂-Bindungsmutante Profilins nicht zu einer vollständigen Suppression der Tumorigenizität in der Maus führte, da kleine Tumoren gebildet wurden. Aufgrund der großen Zeitspanne, die der Versuch mit den Nacktmäusen einnahm, musste geklärt werden, ob alle Tumoren die Profilinmutanten noch stabil exprimieren. Während der Versuchsdauer könnten die injizierten Zellen die integrierten Gene wieder aus dem Genom entfernt haben oder die integrierte DNA hätte im Laufe der Zellteilungen stärker methyliert werden können. Beides hätte zur Reduktion der Expression der Profilinmutanten geführt, wodurch der Profilinspiegel wieder auf das Niveau der Ausgangszelllinie gesunken wäre und die Zellen aufgrund ihres krebsartigen Potentials Tumoren erzeugen würden. Aus diesem Grund wurde Tumorgewebe im Immunblot analysiert. Für alle Mutanten konnte die

Expression mit dem anti-BiPro-Antikörper gezeigt werden. Die quantitative Analyse der Expressionsspiegel ergab, dass die Mutanten gleich stark exprimiert wurden. Dieses Ergebnis belegt, dass die in den Nacktmäusen erzeugten Tumoren tatsächlich durch die Expression der Profilinmutanten verursacht wurden.

Die Anhebung des Profilinspiegels in CAL51-Zellen mit Profilinmutanten hat in dieser Studie ergeben, dass eine intakte Aktinbindungsstelle am Profilin für die Tumorsuppression notwendig ist. Eine Reduktion der PIP₂- oder der Poly-Prolin-Bindung hingegen beeinträchtigte die Tumorsuppressoraktivität nicht im gleichen Maße.

Sicherlich ist die Modulation der Aktinpolymerisation eine sehr wichtige Funktion von Profilin in Zellen. Das Aktin-Cytoskelett ist für Bewegungs- und Transportprozesse von Zellen verantwortlich und viele Cytoskelettproteine sind Tumorsuppressor-Proteine (Ben-Ze'ev, 1997) oder Proto-Oncoproteine (Akisawa et al., 1999). Hierbei sind Cytoskelettproteine betroffen, die die Bündelung und Stabilisierung von Aktinfilamenten (Gluck et al., 1993; Matsumura et al., 1983; Owada et al., 1984), wie auch das Schneiden und „cappen“ der Filamente (Vandekerckhove et al., 1990) oder sogar die Bindung an G-Aktin bewirken (Yamamoto et al., 1993). Darüber hinaus reguliert der Organisationsgrad der Aktinfilamente die Expression der assoziierten Proteine (Bershadsky et al., 1995). Profilin ist aufgrund seiner Polymerisations-fördernden Eigenschaft ein wichtiger Faktor für die dynamische Umorganisation des Aktin-Cytoskeletts der Zelle. Die Verwendung von Profilinmutanten, die aufgrund ihrer Mutationen nicht mehr mit Aktin interagieren jedoch ihre anderen Liganden-Bindungseigenschaften beibehalten haben, hat in mehreren Studien gezeigt, dass wichtige auf Aktindynamik basierende Prozesse nicht mehr vollständig von den Zellen bewältigt werden konnten. COS-7 Zellen zeigten nach Stimulation mit „Epidermal Growth Factor“ eine massive Reduktion in der Formierung von Mikrospikes, wenn eine Aktinbindungsmutante von Profilin verwendet wurde (Suetsugu et al., 1998). Die Expression der in dieser Studie verwendeten Profilinmutante (Y59A) in Profilin-defizienten *Dictyostelium*-Zellen ergab im Vergleich zu Wildtyp Profilin stark verminderte „Rescue“-Effekte (Schluter et al., 1998). Nach Injektion in Fibroblastenzellen waren Aktinbindungsmutanten von Profilin aus der Hefe nicht in der Lage, eine Umorganisation des Aktin-Cytoskeletts zu bewirken (im Gegensatz zu Wildtyp Profilin) (Hajkova et al., 1997). Diese Ergebnisse korrelieren mit den Resultaten dieser Arbeit. Es ist ein weiterer Hinweis darauf, dass Profilin die Organisation des Aktin-Cytoskeletts durch seine direkte Interaktion mit G-Aktin kontrolliert. Welche exakte Funktion von Profilin bei der Aktinpolymerisation,

wie etwa der Nukleotidaustausch am Aktinmolekül oder die Assoziation von Profilin-Aktin-Komplexen an die Plus-Enden von Aktinfilamenten, eine größere Rolle spielt, kann anhand dieser Experimente nicht entschieden werden.

Die Erhöhung des Profilinspiegels mit der PIP₂-Bindungsmutante (PFNI/R88L) Profilins ergab in fast allen angewandten Versuchen eine vollständige Suppression der Tumorigenizität. Zellen, die diese Mutante exprimierten, erzeugten allerdings in der Nacktmaus kleine Tumoren. Wie schon in der Einleitung beschrieben, überlappt die PIP₂-Bindungsstelle mit der Aktinbindungsstelle am Profilinmolekül, was die Konkurrenz dieser beiden Moleküle für die Bindung an Profilin erklärt (Lassing and Lindberg, 1985). Arginin 88 liegt im Bereich der Aktinbindungsstelle (Schutt et al., 1993) doch die Mutante zeigte in unseren Messungen (Schluter, unpublished) keine drastische Verminderung der Fähigkeit Aktin zu binden (siehe Tabelle I.1). Die hier gezeigten Daten zum Verhalten der entsprechenden Zellen in Kultur dokumentieren eine Unterdrückung der krebsartigen Eigenschaften für die PFNI/R88L-transfizierten Klone und die Tumorentwicklung in der Maus ist stark reduziert.

Profilin ist durch die Bindung an PIP₂ eng mit der Signaltransduktion zum Aktin-Cytoskelett verknüpft und PIP₂ kann modulierend auf das Mikrofilamentsystem wirken (Sechi and Wehland, 2000). Beide Moleküle lokalisieren an der Plasmamembran in Bereichen hoher Aktindynamik (Buss et al., 1992; Tall et al., 2000), so dass PIP₂ eine große Rolle für die zeitlich genaue Bereitstellung von Profilin an der Plasmamembran spielen könnte. Der Verlust der PIP₂-Interaktion von Profilin könnte sich daher durchaus negativ auf einen normalen Phänotyp von Zellen auswirken. Für Gelsolin ist ebenfalls eine verringerte Expression in Krebszellen beschrieben (Vandekerckhove et al., 1990) und die Aktin- und PIP₂-Bindungsregion von Gelsolin überlappen (Yin et al., 1988; Yu et al., 1992), wie bei Profilin. Möglicherweise werden beide Proteine über die Bindung an PIP₂ reguliert und der Verlust der PIP₂-Bindung bei diesen Proteinen könnte zu einem krebsartigen Phänotyp von Zellen führen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit implizieren, dass die Aktinbindungsstelle am Profilin für normales epitheliales Wachstum unentbehrlich ist. Dennoch kann man daraus nicht schließen, dass die Bindung an Aktin der entscheidend wichtige Faktor ist. Außer Aktin binden auch der Arp2/3 Komplex und Gephyrin an das gleiche Motiv am Profilin (siehe I.2.1). Der Verlust der Interaktion von Profilin mit einem dieser beiden Proteine, könnte daher ebenfalls an der Beibehaltung des tumorigenen Phänotyps der CAL51 Zellen beteiligt sein. Der Arp2/3

Komplex kann neue Aktinfilamente nukleieren und an bestehenden Filamenten Verzweigungen ausbilden (Mullins and Pollard, 1999). Profilin ist aufgrund der Bindung an den Komplex sicherlich auch an diesen, für die Dynamik der Aktinorganisation wichtigen Prozesse beteiligt.

Gephyrin ist ein weiterer Ligand für Profilin (siehe I.2.1) der über die Aktinbindungsregion mit Profilin interagiert (Giesemann et al., in press). Gephyrin wird ubiquitär exprimiert und katalysiert in der Molybdän-Kofaktor-Synthese den Einbau des Molybdats in das Molybdopterin (Stallmeyer et al., 1995). Möglicherweise bewirkt die Interaktion von Gephyrin mit Profilin eine Anreicherung von Gephyrin im Zellcortex, was für die Molybdän-Kofaktor-Synthese bedeutend sein könnte. Auch dies könnte für normale epitheliale Differenzierung wichtig sein.

Eine Entscheidung darüber, welcher Ligand für die Aktinbindungsstelle am Profilin für normale Zelldifferenzierung funktionell bedeutsam ist, kann aus den vorliegenden Ergebnissen nicht getroffen werden. Berücksichtigt man jedoch die vielfältigen Funktionen des Aktinfilamentsystems bei der Polarisierung und Zell-Kontaktbildung während der Differenzierung epithelialer Gewebe, so scheint ein Defekt von Profilin bei der Bereitstellung Polymerisations-kompetenten Aktins besonders bedeutsam.

1. Ausblick

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse haben gezeigt, dass eine intakte Aktin-Bindungsregion am Profilin für die Tumorsuppression in Brustepithelzellen essentiell ist, während Mutationen in der PIP₂- oder der Poly-Prolin-Bindungsregion nicht zu einer Modulation der Tumorsuppressoraktivität von Profilin in Brustkrebszellen führen.

Problematisch ist bei diesen Versuchsergebnissen, dass der Einfluss des noch vorhandenen endogenen Profilins auf die Tumorsuppression nicht auszuschließen ist. Durch RNAi-Experimente könnte man selektiv den endogenen Profilinspiegel ausschalten und durch Profilinmutanten ersetzen, um eindeutiger Aussagen über die Funktion der Profilin-Ligandenbindung in der Tumorsuppression zu machen. Hierbei handelt es sich allerdings um Mechanismen zur Reduzierung des endogenen Profilinspiegels, die nur über kurze Zeiträume wirken. Für Langzeitversuche, wie z. B. die Tumorbildung in der Nacktmaus, wäre der konditionelle „Knock Out“ von Profilin eine Möglichkeit, das Profilin-Gen über längere Zeiträume zu inaktivieren und damit Rückschlüsse auf die Funktion von Profilin als Tumorsuppressor in Krebszellen zu gewinnen.

Es ist bislang nicht bekannt, ob die verschiedenen Profilin Isoformen sich in ihrer Tumorsuppressoraktivität unterscheiden. Die Restauration des Profilinspiegels mit einer anderen Profilin Isoform, wie z.B. dem neuronal vorwiegend exprimierten Profilin IIa, könnte neue Erkenntnisse über die zelluläre Funktion der Profilin Isoformen ergeben.

V. Literaturverzeichnis

- Aggeler, J., J. Ward, L.M. Blackie, M.H. Barcellos-Hoff, C.H. Streuli, and M.J. Bissell. 1991. Cytodifferentiation of mouse mammary epithelial cells cultured on a reconstituted basement membrane reveals striking similarities to development in vivo. *J Cell Sci.* 99 (Pt 2):407-17.
- Ahern-Djamali, S.M., C. Bachmann, P. Hua, S.K. Reddy, A.S. Kastenmeier, U. Walter, and F.M. Hoffmann. 1999. Identification of profilin and src homology 3 domains as binding partners for Drosophila enabled. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:4977-82.
- Akisawa, N., I. Nishimori, T. Iwamura, S. Onishi, and M.A. Hollingsworth. 1999. High levels of ezrin expressed by human pancreatic adenocarcinoma cell lines with high metastatic potential. *Biochem Biophys Res Commun.* 258:395-400.
- Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, JD. Watson. 1995. Molekularbiologie der Zelle. VCH 3.Auflage
- Archer, S.J., V.K. Vinson, T.D. Pollard, and D.A. Torchia. 1994. Elucidation of the poly-L-proline binding site in Acanthamoeba profilin I by NMR spectroscopy. *FEBS Lett.* 337:145-51.
- Aspenstrom, P., C.E. Schutt, U. Lindberg, and R. Karlsson. 1993. Mutations in beta-actin: influence on polymer formation and on interactions with myosin and profilin. *FEBS Lett.* 329:163-70.
- Battle, E., E. Sancho, C. Franci, D. Dominguez, M. Monfar, J. Baulida, and A. Garcia De Herreros. 2000. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol.* 2:84-9.
- Ben-Ze'ev, A. 1997. Cytoskeletal and adhesion proteins as tumor suppressors. *Curr Opin Cell Biol.* 9:99-108.
- Bershadsky, A.D., U. Gluck, O.N. Denisenko, T.V. Sklyarova, I. Spector, and A. Ben-Ze'ev. 1995. The state of actin assembly regulates actin and vinculin expression by a feedback loop. *J Cell Sci.* 108 (Pt 3):1183-93.
- Bjorkegren, C., M. Rozycki, C.E. Schutt, U. Lindberg, and R. Karlsson. 1993. Mutagenesis of human profilin locates its poly(L-proline)-binding site to a hydrophobic patch of aromatic amino acids. *FEBS Lett.* 333:123-6.
- Bjorkegren-Sjogren, C., E. Korenbaum, P. Nordberg, U. Lindberg, and R. Karlsson. 1997. Isolation and characterization of two mutants of human profilin I that do not bind poly(L-proline). *FEBS Lett.* 418:258-64.
- Blanchard, A., V. Ohanian, and D. Critchley. 1989. The structure and function of alpha-actinin. *J Muscle Res Cell Motil.* 10:280-9.

- Blum, J.L., M.E. Zeigler, and M.S. Wicha. 1987. Regulation of rat mammary gene expression by extracellular matrix components. *Exp Cell Res.* 173:322-40.
- Boshart, M., F. Weber, G. Jahn, K. Dorsch-Hasler, B. Fleckenstein, and W. Schaffner. 1985. A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell.* 41:521-30.
- Boyd, J.A., C.A. Rinehart, Jr., L.A. Walton, G.P. Siegal, and D.G. Kaufman. 1990. Ultrastructural characterization of two new human endometrial carcinoma cell lines and normal human endometrial epithelial cells cultured on extracellular matrix. *In Vitro Cell Dev Biol.* 26:701-8.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-54.
- Braun, A., A. Aszodi, H. Hellebrand, A. Berna, R. Fassler, and O. Brandau. 2002. Genomic organization of profilin-III and evidence for a transcript expressed exclusively in testis. *Gene.* 283:219-25.
- Bretscher, A., and K. Weber. 1980. Fimbrin, a new microfilament-associated protein present in microvilli and other cell surface structures. *J Cell Biol.* 86:335-40.
- Buss, F., C. Temm-Grove, S. Henning, and B.M. Jockusch. 1992. Distribution of profilin in fibroblasts correlates with the presence of highly dynamic actin filaments. *Cell Motil Cytoskeleton.* 22:51-61.
- Button, E., C. Shapland, and D. Lawson. 1995. Actin, its associated proteins and metastasis. *Cell Motil Cytoskeleton.* 30:247-51.
- Cao, L.G., G.G. Babcock, P.A. Rubenstein, and Y.L. Wang. 1992. Effects of profilin and profilactin on actin structure and function in living cells. *J Cell Biol.* 117:1023-9.
- Carrier, M.F., C. Jean, K.J. Rieger, M. Lenfant, and D. Pantaloni. 1993. Modulation of the interaction between G-actin and thymosin beta 4 by the ATP/ADP ratio: possible implication in the regulation of actin dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:5034-8.
- Carrier, M.F., and D. Pantaloni. 1997. Control of actin dynamics in cell motility. *J Mol Biol.* 269:459-67.
- Carlsson, L., L.E. Nystrom, I. Sundkvist, F. Markey, and U. Lindberg. 1977. Actin polymerizability is influenced by profilin, a low molecular weight protein in non-muscle cells. *J Mol Biol.* 115:465-83.
- Chang, F., D. Drubin, and P. Nurse. 1997. cdc12p, a protein required for cytokinesis in fission yeast, is a component of the cell division ring and interacts with profilin. *J Cell Biol.* 137:169-82.
- Chen, C.L., S.S. Liu, S.M. Ip, L.C. Wong, T.Y. Ng, and H.Y. Ngan. 2003. E-cadherin expression is silenced by DNA methylation in cervical cancer cell lines and tumours. *Eur J Cancer.* 39:517-23.

- Clark, T.G., and J.L. Rosenbaum. 1979. An actin filament matrix in hand-isolated nuclei of *X. laevis* oocytes. *Cell*. 18:1101-8.
- Condeelis, J. 2001. How is actin polymerization nucleated in vivo? *Trends Cell Biol.* 11:288-93.
- Craig, S.W., and L.D. Powell. 1980. Regulation of actin polymerization by villin, a 95,000 dalton cytoskeletal component of intestinal brush borders. *Cell*. 22:739-46.
- Di Nardo, A., R. Gareus, D. Kwiatkowski, and W. Witke. 2000. Alternative splicing of the mouse profilin II gene generates functionally different profilin isoforms. *J Cell Sci.* 113 Pt 21:3795-803.
- Egile, C., T.P. Loisel, V. Laurent, R. Li, D. Pantaloni, P.J. Sansonetti, and M.F. Carlier. 1999. Activation of the CDC42 effector N-WASP by the shigella flexneri IcsA protein promotes actin nucleation by Arp2/3 complex and bacterial actin- based motility [In Process Citation]. *J Cell Biol.* 146:1319-32.
- Evangelista, M., K. Blundell, M.S. Longtine, C.J. Chow, N. Adames, J.R. Pringle, M. Peter, and C. Boone. 1997. Bni1p, a yeast formin linking cdc42p and the actin cytoskeleton during polarized morphogenesis. *Science*. 276:118-22.
- Fedorov, A.A., K.A. Magnus, M.H. Graupe, E.E. Lattman, T.D. Pollard, and S.C. Almo. 1994. X-ray structures of isoforms of the actin-binding protein profilin that differ in their affinity for phosphatidylinositol phosphates. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:8636-40.
- Finkel, T., J.A. Theriot, K.R. Dose, G.F. Tomaselli, and P.J. Goldschmidt-Clermont. 1994. Dynamic actin structures stabilized by profilin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:1510-4.
- Freedman, V.H., and S.I. Shin. 1974. Cellular tumorigenicity in nude mice: correlation with cell growth in semi-solid medium. *Cell*. 3:355-9.
- Fujiwara, I., S. Suetsugu, S. Uemura, T. Takenawa, and S. Ishiwata. 2002a. Visualization and force measurement of branching by Arp2/3 complex and N-WASP in actin filament. *Biochem Biophys Res Commun.* 293:1550-5.
- Fujiwara, I., S. Takahashi, H. Tadakuma, T. Funatsu, and S. Ishiwata. 2002b. Microscopic analysis of polymerization dynamics with individual actin filaments. *Nat Cell Biol.* 4:666-73.
- Geese, M., K. Schluter, M. Rothkegel, B.M. Jockusch, J. Wehland, and A.S. Sechi. 2000. Accumulation of profilin II at the surface of *Listeria* is concomitant with the onset of motility and correlates with bacterial speed. *J Cell Sci.* 113 (Pt 8):1415-26.
- Gertler, F.B., K. Niebuhr, M. Reinhard, J. Wehland, and P. Soriano. 1996. Mena, a relative of VASP and *Drosophila Enabled*, is implicated in the control of microfilament dynamics. *Cell*. 87:227-39.
- Gieselmann, R., D.J. Kwiatkowski, P.A. Janmey, and W. Witke. 1995. Distinct biochemical characteristics of the two human profilin isoforms. *Eur J Biochem.* 229:621-8.

- Gieseemann, T., S. Rathke-Hartlieb, M. Rothkegel, J.W. Bartsch, S. Buchmeier, B.M. Jockusch, and H. Jockusch. 1999. A role for polyproline motifs in the spinal muscular atrophy protein SMN. Profilins bind to and colocalize with smn in nuclear gems. *J Biol Chem.* 274:37908-14.
- Gieseemann, T., Schwarz, G., Nawrotzki, R., Berhörster, K., Rothkegel, M., Schlüter, K., Schrader, N., Schindelin, H., Mendel, R.R., Kirsch, J., and Jockusch, B.M. Komplex formation between the postsynaptic scaffolding protein gephyrin, profilin and Mena: A possible link to the microfilament system. *J Neurosci*, in press
- Gilmore, A.P., and K. Burridge. 1996a. Regulation of vinculin binding to talin and actin by phosphatidyl- inositol-4-5-bisphosphate. *Nature.* 381:531-5.
- Gilmore, A.P., and K. Burridge. 1996b. Regulation of vinculin binding to talin and actin by phosphatidyl-inositol-4-5-bisphosphate. *Nature.* 381:531-5.
- Gioanni, J., D. Le Francois, E. Zanghellini, C. Mazeau, F. Ettore, J.C. Lambert, M. Schneider, and B. Dutrillaux. 1990. Establishment and characterisation of a new tumorigenic cell line with a normal karyotype derived from a human breast adenocarcinoma. *Br J Cancer.* 62:8-13.
- Giovanella, B.C., J.S. Stehlin, and L.J. Williams, Jr. 1974. Heterotransplantation of human malignant tumors in "nude" thymusless mice. II. Malignant tumors induced by injection of cell cultures derived from human solid tumors. *J Natl Cancer Inst.* 52:921-30.
- Gluck, U., D.J. Kwiatkowski, and A. Ben-Ze'ev. 1993. Suppression of tumorigenicity in simian virus 40-transformed 3T3 cells transfected with alpha-actinin cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:383-7.
- Goldschmidt-Clermont, P.J., M.I. Furman, D. Wachsstock, D. Safer, V.T. Nachmias, and T.D. Pollard. 1992. The control of actin nucleotide exchange by thymosin beta 4 and profilin. A potential regulatory mechanism for actin polymerization in cells. *Mol Biol Cell.* 3:1015-24.
- Goldschmidt-Clermont, P.J., J.W. Kim, L.M. Machesky, S.G. Rhee, and T.D. Pollard. 1991. Regulation of phospholipase C-gamma 1 by profilin and tyrosine phosphorylation. *Science.* 251:1231-3.
- Gonsior, S.M., S. Platz, S. Buchmeier, U. Scheer, B.M. Jockusch, and H. Hinssen. 1999. Conformational difference between nuclear and cytoplasmic actin as detected by a monoclonal antibody. *J Cell Sci.* 112:797-809.
- Gonzalez-Garay, M.L., and F. Cabral. 1996. alpha-Tubulin limits its own synthesis: evidence for a mechanism involving translational repression. *J Cell Biol.* 135:1525-34.
- Gorlin, J.B., R. Yamin, S. Egan, M. Stewart, T.P. Stossel, D.J. Kwiatkowski, and J.H. Hartwig. 1990. Human endothelial actin-binding protein (ABP-280, nonmuscle filamin): a molecular leaf spring. *J Cell Biol.* 111:1089-105.
- Grenklo, S., M. Geese, U. Lindberg, J. Wehland, R. Karlsson, and A.S. Sechi. 2003. A crucial role for profilin-actin in the intracellular motility of *Listeria monocytogenes*. *EMBO Rep.* 4:1-7.

- Haarer, B.K., and S.S. Brown. 1990. Structure and function of profilin. *Cell Motil Cytoskeleton*. 17:71-4.
- Haarer, B.K., A.S. Petzold, and S.S. Brown. 1993. Mutational analysis of yeast profilin. *Mol Cell Biol*. 13:7864-73.
- Haffner, C., T. Jarchau, M. Reinhard, J. Hoppe, S.M. Lohmann, and U. Walter. 1995. Molecular cloning, structural analysis and functional expression of the proline-rich focal adhesion and microfilament-associated protein VASP. *Embo J*. 14:19-27.
- Hajkova, L., C. Bjorkegren Sjogren, E. Korenbaum, P. Nordberg, and R. Karlsson. 1997. Characterization of a mutant profilin with reduced actin-binding capacity: effects in vitro and in vivo. *Exp Cell Res*. 234:66-77.
- Hammond, S.M., A.A. Caudy, and G.J. Hannon. 2001. Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nat Rev Genet*. 2:110-9.
- Hartwig, J.H., K.A. Chambers, K.L. Hopcia, and D.J. Kwiatkowski. 1989. Association of profilin with filament-free regions of human leukocyte and platelet membranes and reversible membrane binding during platelet activation. *J Cell Biol*. 109:1571-9.
- Haugwitz, M., A.A. Noegel, D. Rieger, F. Lottspeich, and M. Schleicher. 1991. Dictyostelium discoideum contains two profilin isoforms that differ in structure and function. *J Cell Sci*. 100:481-9.
- Holt, M.R., and A. Koffer. 2001. Cell motility: proline-rich proteins promote protrusions. *Trends Cell Biol*. 11:38-46.
- Honjo, Y., P. Nangia-Makker, H. Inohara, and A. Raz. 2001. Down-regulation of galectin-3 suppresses tumorigenicity of human breast carcinoma cells. *Clin Cancer Res*. 7:661-8.
- Honore, B., P. Madsen, A.H. Andersen, and H. Leffers. 1993. Cloning and expression of a novel human profilin variant, profilin II. *FEBS Lett*. 330:151-5.
- Hu, E., Z. Chen, T. Fredrickson, and Y. Zhu. 2001. Molecular cloning and characterization of profilin-3: a novel cytoskeleton-associated gene expressed in rat kidney and testes. *Exp Nephrol*. 9:265-74.
- Huttelmaier, S., O. Mayboroda, B. Harbeck, T. Jarchau, B.M. Jockusch, and M. Rudiger. 1998. The interaction of the cell-contact proteins VASP and vinculin is regulated by phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Curr Biol*. 8:479-88.
- Ishikawa, H., R. Bischoff, and H. Holtzer. 1969. Formation of arrowhead complexes with heavy meromyosin in a variety of cell types. *J Cell Biol*. 43:312-28.
- Janke, J., K. Schluter, B. Jandrig, M. Theile, K. Kolble, W. Arnold, E. Grinstein, A. Schwartz, L. Estevez-Schwarz, P.M. Schlag, B.M. Jockusch, and S. Scherneck. 2000. Suppression of tumorigenicity in breast cancer cells by the microfilament protein profilin 1. *J Exp Med*. 191:1675-86.
- Janssen, R.A., and J.W. Mier. 1997. Tropomyosin-2 cDNA lacking the 3' untranslated region riboregulator induces growth inhibition of v-Ki-ras-transformed fibroblasts. *Mol Biol Cell*. 8:897-908.

- Jockusch, B.M., M. Becker, I. Hindennach, and E. Jockusch. 1974. Slime mould actin: homology to vertebrate actin and presence in the nucleus. *Exp Cell Res.* 89:241-6.
- Kaiser, D.A., P.J. Goldschmidt-Clermont, B.A. Levine, and T.D. Pollard. 1989. Characterization of renatured profilin purified by urea elution from poly-L-proline agarose columns. *Cell Motil Cytoskeleton.* 14:251-62.
- Kaul, S.C., R. Kawai, H. Nomura, Y. Mitsui, R.R. Reddel, and R. Wadhwa. 1999. Identification of a 55-kDa ezrin-related protein that induces cytoskeletal changes and localizes to the nucleolus. *Exp Cell Res.* 250:51-61.
- Kirsch, J., J. Kuhse, and H. Betz. 1995. Targeting of glycine receptor subunits to gephyrin-rich domains in transfected human embryonic kidney cells. *Mol Cell Neurosci.* 6:450-61.
- Kleinman, H.K., M.L. McGarvey, L.A. Liotta, P.G. Robey, K. Tryggvason, and G.R. Martin. 1982. Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma. *Biochemistry.* 21:6188-93.
- Knezevic, I., T.M. Leisner, and S.C. Lam. 1996. Direct binding of the platelet integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$ (GPIIb-IIIa) to talin. Evidence that interaction is mediated through the cytoplasmic domains of both αIIb and $\beta 3$. *J Biol Chem.* 271:16416-21.
- Krebs, A., M. Rothkegel, M. Klar, and B.M. Jockusch. 2001. Characterization of functional domains of mDia1, a link between the small GTPase Rho and the actin cytoskeleton. *J Cell Sci.* 114:3663-72.
- Lambrechts, A., A. Braun, V. Jonckheere, A. Aszodi, L.M. Lanier, J. Robbins, I. Van Colen, J. Vandekerckhove, R. Fassler, and C. Ampe. 2000. Profilin II is alternatively spliced, resulting in profilin isoforms that are differentially expressed and have distinct biochemical properties. *Mol Cell Biol.* 20:8209-19.
- Lambrechts, A., V. Jonckheere, D. Dewitte, J. Vandekerckhove, and C. Ampe. 2002. Mutational analysis of human profilin I reveals a second PI(4,5)-P2 binding site neighbouring the poly(L-proline) binding site. *BMC Biochem.* 3:12.
- Lambrechts, A., J.L. Verschelde, V. Jonckheere, M. Goethals, J. Vandekerckhove, and C. Ampe. 1997. The mammalian profilin isoforms display complementary affinities for PIP2 and proline-rich sequences. *Embo J.* 16:484-94.
- Lassing, I., and U. Lindberg. 1985. Specific interaction between phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and profilactin. *Nature.* 314:472-4.
- Laurent, V., T.P. Loisel, B. Harbeck, A. Wehman, L. Grobe, B.M. Jockusch, J. Wehland, F.B. Gertler, and M.F. Carlier. 1999. Role of proteins of the Ena/VASP family in actin-based motility of *Listeria monocytogenes*. *J Cell Biol.* 144:1245-58.
- Leung, W.K., J. Yu, A.H. Bai, M.W. Chan, K.K. Chan, K.F. To, F.K. Chan, E.K. Ng, S.C. Chung, and J.J. Sung. 2003. Inactivation of helicase-like transcription factor by promoter hypermethylation in human gastric cancer. *Mol Carcinog.* 37:91-7.
- Levine, A.J., J. Momand, and C.A. Finlay. 1991. The p53 tumour suppressor gene. *Nature.* 351:453-6.

- Lim, R., F.J. Alvarez, and B. Walmsley. 1999. Quantal size is correlated with receptor cluster area at glycinergic synapses in the rat brainstem. *J Physiol.* 516 (Pt 2):505-12.
- Lindberg, U., C.E. Schutt, E. Hellsten, A.C. Tjader, and T. Hult. 1988. The use of poly(L-proline)-Sepharose in the isolation of profilin and profilactin complexes. *Biochim Biophys Acta.* 967:391-400.
- Lu, J., and T.D. Pollard. 2001. Profilin binding to poly-L-proline and actin monomers along with ability to catalyze actin nucleotide exchange is required for viability of fission yeast. *Mol Biol Cell.* 12:1161-75.
- Machesky, L.M., S.J. Atkinson, C. Ampe, J. Vandekerckhove, and T.D. Pollard. 1994. Purification of a cortical complex containing two unconventional actins from *Acanthamoeba* by affinity chromatography on profilin-agarose. *J Cell Biol.* 127:107-15.
- Machesky, L.M., P.J. Goldschmidt-Clermont, and T.D. Pollard. 1990. The affinities of human platelet and *Acanthamoeba* profilin isoforms for polyphosphoinositides account for their relative abilities to inhibit phospholipase C. *Cell Regul.* 1:937-50.
- Machesky, L.M., and K.L. Gould. 1999. The Arp2/3 complex: a multifunctional actin organizer. *Curr Opin Cell Biol.* 11:117-21.
- Mahadev, K., G. Raval, S. Bharadwaj, M.C. Willingham, E.M. Lange, B. Vonderhaar, D. Salomon, and G.L. Prasad. 2002. Suppression of the transformed phenotype of breast cancer by tropomyosin-1. *Exp Cell Res.* 279:40-51.
- Mahoney, N.M., P.A. Janmey, and S.C. Almo. 1997. Structure of the profilin-poly-L-proline complex involved in morphogenesis and cytoskeletal regulation [published erratum appears in Nat Struct Biol 1997 Dec;4(12):1047]. *Nat Struct Biol.* 4:953-60.
- Malm, B., H. Larsson, and U. Lindberg. 1983. The profilin-actin complex: further characterization of profilin and studies on the stability of the complex. *J Muscle Res Cell Motil.* 4:569-88.
- Mammoto, A., T. Sasaki, T. Asakura, I. Hotta, H. Imamura, K. Takahashi, Y. Matsuura, T. Shirao, and Y. Takai. 1998. Interactions of drebrin and gephyrin with profilin. *Biochem Biophys Res Commun.* 243:86-9.
- Manseau, L., J. Calley, and H. Phan. 1996. Profilin is required for posterior patterning of the *Drosophila* oocyte. *Development.* 122:2109-16.
- Marzesco, A.M., I. Dunia, R. Pandjaitan, M. Recouvreur, D. Dauzonne, E.L. Benedetti, D. Louvard, and A. Zahraoui. 2002. The small GTPase Rab13 regulates assembly of functional tight junctions in epithelial cells. *Mol Biol Cell.* 13:1819-31.
- Matsumura, F., J.J. Lin, S. Yamashiro-Matsumura, G.P. Thomas, and W.C. Topp. 1983. Differential expression of tropomyosin forms in the microfilaments isolated from normal and transformed rat cultured cells. *J Biol Chem.* 258:13954-64.
- Mayboroda, O., K. Schluter, and B.M. Jockusch. 1997. Differential colocalization of profilin with microfilaments in PtK2 cells. *Cell Motil Cytoskeleton.* 37:166-77.

- Metzler, W.J., A.J. Bell, E. Ernst, T.B. Lavoie, and L. Mueller. 1994. Identification of the poly-L-proline-binding site on human profilin. *J Biol Chem.* 269:4620-5.
- Moldovan, N.I., E.E. Milliken, K. Irani, J. Chen, R.H. Sohn, T. Finkel, and P.J. Goldschmidt-Clermont. 1997. Regulation of endothelial cell adhesion by profilin. *Curr Biol.* 7:24-30.
- Mullins, R.D., J.A. Heuser, and T.D. Pollard. 1998. The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:6181-6.
- Mullins, R.D., and T.D. Pollard. 1999. Structure and function of the Arp2/3 complex. *Curr Opin Struct Biol.* 9:244-9.
- Neely, M.D., and E. Macaluso. 1997. Motile areas of leech neurites are rich in microfilaments and two actin-binding proteins: gelsolin and profilin. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 264:1701-6.
- Niebuhr, K., F. Ebel, R. Frank, M. Reinhard, E. Domann, U.D. Carl, U. Walter, F.B. Gertler, J. Wehland, and T. Chakraborty. 1997. A novel proline-rich motif present in ActA of *Listeria monocytogenes* and cytoskeletal proteins is the ligand for the EVH1 domain, a protein module present in the Ena/VASP family. *Embo J.* 16:5433-44.
- Nodelman, I.M., G.D. Bowman, U. Lindberg, and C.E. Schutt. 1999. X-ray structure determination of human profilin II: A comparative structural analysis of human profilins. *J Mol Biol.* 294:1271-85.
- Nyman, T., R. Page, C.E. Schutt, R. Karlsson, and U. Lindberg. 2002. A cross-linked profilin-actin heterodimer interferes with elongation at the fast-growing end of F-actin. *J Biol Chem.* 277:15828-33.
- Ostrander, D.B., J.A. Gorman, and G.M. Carman. 1995. Regulation of profilin localization in *Saccharomyces cerevisiae* by phosphoinositide metabolism. *J Biol Chem.* 270:27045-50.
- Otterbein, L.R., P. Graceffa, and R. Dominguez. 2001. The crystal structure of uncomplexed actin in the ADP state. *Science.* 293:708-11.
- Owada, M.K., A. Hakura, K. Iida, I. Yahara, K. Sobue, and S. Kakiuchi. 1984. Occurrence of caldesmon (a calmodulin-binding protein) in cultured cells: comparison of normal and transformed cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 81:3133-7.
- Pantaloni, D., R. Boujemaa, D. Didry, P. Gounon, and M.F. Carlier. 2000. The Arp2/3 complex branches filament barbed ends: functional antagonism with capping proteins. *Nat Cell Biol.* 2:385-91.
- Pantaloni, D., and M.F. Carlier. 1993. How profilin promotes actin filament assembly in the presence of thymosin beta 4. *Cell.* 75:1007-14.
- Pantelouris, E.M. 1968. Absence of thymus in a mouse mutant. *Nature.* 217:370-1.
- Parish, R.W., C. Schmidhauser, T. Schmidt, and R.K. Dudler. 1987. Mechanisms of tumour cell metastasis. *J Cell Sci Suppl.* 8:181-97.

- Pawlak, G., and D.M. Helfman. 2001. Cytoskeletal changes in cell transformation and tumorigenesis. *Curr Opin Genet Dev.* 11:41-7.
- Perelroizen, I., M.F. Carlier, and D. Pantaloni. 1995. Binding of divalent cation and nucleotide to G-actin in the presence of profilin. *J Biol Chem.* 270:1501-8.
- Perelroizen, I., J.B. Marchand, L. Blanchoin, D. Didry, and M.F. Carlier. 1994. Interaction of profilin with G-actin and poly(L-proline). *Biochemistry.* 33:8472-8.
- Petersen, O.W., L. Ronnov-Jessen, A.R. Howlett, and M.J. Bissell. 1992. Interaction with basement membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation pattern of normal and malignant human breast epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:9064-8.
- Pistor, S., T. Chakraborty, U. Walter, and J. Wehland. 1995. The bacterial actin nucleator protein ActA of *Listeria monocytogenes* contains multiple binding sites for host microfilament proteins. *Curr Biol.* 5:517-25.
- Pollard, T.D., S. Almo, S. Quirk, V. Vinson, and E.E. Lattman. 1994. Structure of actin binding proteins: insights about function at atomic resolution. *Annu Rev Cell Biol.* 10:207-49.
- Pollard, T.D., L. Blanchoin, and R.D. Mullins. 2000. Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 29:545-76.
- Pollard, T.D., and G.G. Borisy. 2003. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell.* 112:453-65.
- Pollard, T.D., and J.A. Cooper. 1984. Quantitative analysis of the effect of *Acanthamoeba* profilin on actin filament nucleation and elongation. *Biochemistry.* 23:6631-41.
- Povlsen, C.O., P.J. Fialkow, E. Klein, G. Klein, J. Rygaard, and F. Wiener. 1973. Growth and antigenic properties of a biopsy-derived Burkitt's lymphoma in thymus-less (nude) mice. *Int J Cancer.* 11:30-9.
- Pring, M., A. Weber, and M.R. Bubb. 1992. Profilin-actin complexes directly elongate actin filaments at the barbed end. *Biochemistry.* 31:1827-36.
- Purich, D.L., and F.S. Southwick. 1997. ABM-1 and ABM-2 homology sequences: consensus docking sites for actin- based motility defined by oligoproline regions in *Listeria* ActA surface protein and human VASP. *Biochem Biophys Res Commun.* 231:686-91.
- Ramesh, N., I.M. Anton, J.H. Hartwig, and R.S. Geha. 1997. WIP, a protein associated with wiskott-aldrich syndrome protein, induces actin polymerization and redistribution in lymphoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:14671-6.
- Reinhard, M., K. Giehl, K. Abel, C. Haffner, T. Jarchau, V. Hoppe, B.M. Jockusch, and U. Walter. 1995a. The proline-rich focal adhesion and microfilament protein VASP is a ligand for profilins. *Embo J.* 14:1583-9. 92:7956-60
- Reinhard, M., K. Jouvenal, D. Tripier, U. Walter. Identification, purification, and characterization of a zyxin-related protein that binds the focal adhesion and

- microfilament protein VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein). *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:7956-60
- Reinhard, M., M. Halbrugge, U. Scheer, C. Wiegand, B.M. Jockusch, and U. Walter. 1992. The 46/50 kDa phosphoprotein VASP purified from human platelets is a novel protein associated with actin filaments and focal contacts. *Embo J.* 11:2063-70.
- Reiss, J., S. Gross-Hardt, E. Christensen, P. Schmidt, R.R. Mendel, and G. Schwarz. 2001. A mutation in the gene for the neurotransmitter receptor-clustering protein gephyrin causes a novel form of molybdenum cofactor deficiency. *Am J Hum Genet.* 68:208-13.
- Ridley, A.J., and A. Hall. 1992. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell.* 70:389-99.
- Rodriguez Fernandez, J.L., B. Geiger, D. Salomon, I. Sabanay, M. Zoller, and A. Ben-Ze'ev. 1992. Suppression of tumorigenicity in transformed cells after transfection with vinculin cDNA. *J Cell Biol.* 119:427-38.
- Rohatgi, R., H.Y. Ho, and M.W. Kirschner. 2000. Mechanism of N-WASP activation by CDC42 and phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. *J Cell Biol.* 150:1299-310.
- Rothkegel, M., O. Mayboroda, M. Rohde, C. Wuchterpfennig, R. Valenta, and B.M. Jockusch. 1996. Plant and animal profilins are functionally equivalent and stabilize microfilaments in living animal cells. *J Cell Sci.* 109:83-90.
- Rottner, K., B. Behrendt, J.V. Small, and J. Wehland. 1999. VASP dynamics during lamellipodia protrusion. *Nat Cell Biol.* 1:321-2.
- Rudiger, M., B.M. Jockusch, and M. Rothkegel. 1997. Epitope tag-antibody combination useful for the detection of protein expression in prokaryotic and eukaryotic cells. *Biotechniques.* 23:96-7.
- Rygaard, J. 1969. Immunobiology of the mouse mutant "Nude". Preliminary investigations. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 77:761-2.
- Safer, D., M. Elzinga, and V.T. Nachmias. 1991. Thymosin beta 4 and Fx, an actin-sequestering peptide, are indistinguishable. *J Biol Chem.* 266:4029-32.
- Sakisaka, T., T. Itoh, K. Miura, and T. Takenawa. 1997. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphatase regulates the rearrangement of actin filaments. *Mol Cell Biol.* 17:3841-9.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74:5463-7.
- Satyaswaroop, P.G., and S.S. Tabibzadeh. 1991. Extracellular matrix and the patterns of differentiation of human endometrial carcinomas in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 51:5661-6.
- Schafer, D.A., and J.A. Cooper. 1995. Control of actin assembly at filament ends. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 11:497-518.

- Schluter, K., M. Schleicher, and B.M. Jockusch. 1998. Effects of single amino acid substitutions in the actin-binding site on the biological activity of bovine profilin I. *J Cell Sci.* 111 (Pt 22):3261-73.
- Schulze, H., A. Huckriede, A.A. Noegel, M. Schleicher, and B.M. Jockusch. 1989. Alpha-actinin synthesis can be modulated by antisense probes and is autoregulated in non-muscle cells. *Embo J.* 8:3587-93.
- Schutt, C.E., J.C. Myslik, M.D. Rozycki, N.C. Goonesekere, and U. Lindberg. 1993. The structure of crystalline profilin-beta-actin. *Nature.* 365:810-6.
- Sechi, A.S., and J. Wehland. 2000. The actin cytoskeleton and plasma membrane connection: PtdIns(4,5)P(2) influences cytoskeletal protein activity at the plasma membrane. *J Cell Sci.* 113 Pt 21:3685-95.
- Selden, L.A., H.J. Kinosian, J.E. Estes, and L.C. Gershman. 1999. Impact of profilin on actin-bound nucleotide exchange and actin polymerization dynamics. *Biochemistry.* 38:2769-78.
- Shapland, C., P. Lowings, and D. Lawson. 1988. Identification of new actin-associated polypeptides that are modified by viral transformation and changes in cell shape. *J Cell Biol.* 107:153-61.
- Shin, S.I., V.H. Freedman, R. Risser, and R. Pollack. 1975. Tumorigenicity of virus-transformed cells in nude mice is correlated specifically with anchorage independent growth in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 72:4435-9.
- Siegfried, Z., S. Eden, M. Mendelsohn, X. Feng, B.Z. Tsuberi, and H. Cedar. 1999. DNA methylation represses transcription in vivo. *Nat Genet.* 22:203-6.
- Singh, S.S., A. Chauhan, N. Murakami, and V.P. Chauhan. 1996a. Profilin and gelsolin stimulate phosphatidylinositol 3-kinase activity. *Biochemistry.* 35:16544-9.
- Singh, S.S., A. Chauhan, N. Murakami, J. Styles, M. Elzinga, and V.P. Chauhan. 1996b. Phosphoinositide-dependent in vitro phosphorylation of profilin by protein kinase C. Phospholipid specificity and localization of the phosphorylation site. *Recept Signal Transduct.* 6:77-86.
- Skare, P., and R. Karlsson. 2002. Evidence for two interaction regions for phosphatidylinositol(4,5)-bisphosphate on mammalian profilin I. *FEBS Lett.* 522:119-24.
- Skare, P., J.P. Kreivi, A. Bergstrom, and R. Karlsson. 2003. Profilin I colocalizes with speckles and Cajal bodies: a possible role in pre-mRNA splicing. *Exp Cell Res.* 286:12-21.
- Small, J.V., K. Anderson, and K. Rottner. 1996. Actin and the coordination of protrusion, attachment and retraction in cell crawling. *Biosci Rep.* 16:351-68.
- Sohn, R.H., J. Chen, K.S. Koblan, P.F. Bray, and P.J. Goldschmidt-Clermont. 1995. Localization of a binding site for phosphatidylinositol 4,5- bisphosphate on human profilin. *J Biol Chem.* 270:21114-20.

- Sohn, R.H., and P.J. Goldschmidt-Clermont. 1994. Profilin: at the crossroads of signal transduction and the actin cytoskeleton. *Bioessays*. 16:465-72.
- Soule, H.D., T.M. Maloney, S.R. Wolman, W.D. Peterson, Jr., R. Brenz, C.M. McGrath, J. Russo, R.J. Pauley, R.F. Jones, and S.C. Brooks. 1990. Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. *Cancer Res.* 50:6075-86.
- Stallmeyer, B., A. Nerlich, J. Schiemann, H. Brinkmann, and R.R. Mendel. 1995. Molybdenum co-factor biosynthesis: the *Arabidopsis thaliana* cDNA *cnx1* encodes a multifunctional two-domain protein homologous to a mammalian neuroprotein, the insect protein Cinnamon and three *Escherichia coli* proteins. *Plant J.* 8:751-62.
- Streuli, C.H., N. Bailey, and M.J. Bissell. 1991. Control of mammary epithelial differentiation: basement membrane induces tissue-specific gene expression in the absence of cell-cell interaction and morphological polarity. *J Cell Biol.* 115:1383-95.
- Suetsugu, S., H. Miki, and T. Takenawa. 1998. The essential role of profilin in the assembly of actin for microspike formation. *Embo J.* 17:6516-26.
- Sun, H.Q., K. Kwiatkowska, and H.L. Yin. 1995. Actin monomer binding proteins. *Curr Opin Cell Biol.* 7:102-10.
- Tall, E.G., I. Spector, S.N. Pentyla, I. Bitter, and M.J. Rebecchi. 2000. Dynamics of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in actin-rich structures. *Curr Biol.* 10:743-6.
- Tanaka, M., and H. Shibata. 1985. Poly(L-proline)-binding proteins from chick embryos are a profilin and a profilactin. *Eur J Biochem.* 151:291-7.
- Tang, D.D., and J. Tan. 2003. Downregulation of profilin with antisense oligodeoxynucleotides inhibits force development during stimulation of smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*
- Theile, M., S. Hartmann, H. Scherthan, W. Arnold, W. Deppert, R. Frege, F. Glaab, W. Haensch, and S. Scherneck. 1995. Suppression of tumorigenicity of breast cancer cells by transfer of human chromosome 17 does not require transferred BRCA1 and p53 genes. *Oncogene.* 10:439-47.
- Theriot, J.A., and T.J. Mitchison. 1993. The three faces of profilin. *Cell.* 75:835-8.
- Theriot, J.A., J. Rosenblatt, D.A. Portnoy, P.J. Goldschmidt-Clermont, and T.J. Mitchison. 1994. Involvement of profilin in the actin-based motility of *L. monocytogenes* in cells and in cell-free extracts. *Cell.* 76:505-17.
- Tilney, L.G., E.M. Bonder, L.M. Coluccio, and M.S. Mooseker. 1983. Actin from *Thyone* sperm assembles on only one end of an actin filament: a behavior regulated by profilin. *J Cell Biol.* 97:112-24.
- Tobacman, L.S., and E.D. Korn. 1982. The regulation of actin polymerization and the inhibition of monomeric actin ATPase activity by *Acanthamoeba* profilin. *J Biol Chem.* 257:4166-70.

- Van Troys, M., D. Dewitte, J.L. Verschelde, M. Goethals, J. Vandekerckhove, and C. Ampe. 2000. The competitive interaction of actin and PIP2 with actophorin is based on overlapping target sites: design of a gain-of-function mutant. *Biochemistry*. 39:12181-9.
- Vandekerckhove, J., G. Bauw, K. Vancompernelle, B. Honore, and J. Celis. 1990. Comparative two-dimensional gel analysis and microsequencing identifies gelsolin as one of the most prominent downregulated markers of transformed human fibroblast and epithelial cells. *J Cell Biol.* 111:95-102.
- Vandekerckhove, J.S., D.A. Kaiser, and T.D. Pollard. 1989. Acanthamoeba actin and profilin can be cross-linked between glutamic acid 364 of actin and lysine 115 of profilin. *J Cell Biol.* 109:619-26.
- Vemuri, B., and S.S. Singh. 2001. Protein kinase C isozyme-specific phosphorylation of profilin. *Cell Signal.* 13:433-9.
- Verheyen, E.M., and L. Cooley. 1994. Profilin mutations disrupt multiple actin-dependent processes during Drosophila development. *Development.* 120:717-28.
- Wang, X., M. Kibschull, M.M. Laue, B. Lichte, E. Petrasch-Parwez, M.W. Kilimann, M.L. allergen-specific T-cell reactions. *J Cell Biol.* 147:151-62.
- Watanabe, N., P. Madaule, T. Reid, T. Ishizaki, G. Watanabe, A. Kakizuka, Y. Saito, K. Nakao, B.M. Jockusch, and S. Narumiya. 1997. p140mDia, a mammalian homolog of Drosophila diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin. *Embo J.* 16:3044-56.
- Welch, M.D. 1999. The world according to Arp: regulation of actin nucleation by the Arp2/3 complex. *Trends Cell Biol.* 9:423-7.
- Welch, M.D., J. Rosenblatt, J. Skoble, D.A. Portnoy, and T.J. Mitchison. 1998. Interaction of human Arp2/3 complex and the Listeria monocytogenes ActA protein in actin filament nucleation. *Science.* 281:105-8.
- White, T.E., P.A. di Sant'Agnese, and R.K. Miller. 1990. Human endometrial cells grown on an extracellular matrix form simple columnar epithelia and glands. *In Vitro Cell Dev Biol.* 26:636-42.
- Wicha, M.S., G. Lowrie, E. Kohn, P. Bagavandoss, and T. Mahn. 1982. Extracellular matrix promotes mammary epithelial growth and differentiation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 79:3213-7.
- Witke, W., J.D. Sutherland, A. Sharpe, M. Arai, and D.J. Kwiatkowski. 2001. Profilin I is essential for cell survival and cell division in early mouse development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:3832-6.
- Wittenmayer, N., M. Rothkegel, B.M. Jockusch, and K. Schluter. 2000. Functional characterization of green fluorescent protein-profilin fusion proteins. *Eur J Biochem.* 267:5247-56.
- Yamamoto, K., J.D. Pardee, J. Reidler, L. Stryer, and J.A. Spudich. 1982. Mechanism of interaction of Dictyostelium severin with actin filaments. *J Cell Biol.* 95:711-9.

- Yamamoto, T., M. Gotoh, M. Kitajima, and S. Hirohashi. 1993. Thymosin beta-4 expression is correlated with metastatic capacity of colorectal carcinomas. *Biochem Biophys Res Commun.* 193:706-10.
- Yang, C., M. Huang, J. DeBiasio, M. Pring, M. Joyce, H. Miki, T. Takenawa, and S.H. Zigmond. 2000. Profilin enhances Cdc42-induced nucleation of actin polymerization. *J Cell Biol.* 150:1001-12.
- Yin, H.L., K. Iida, and P.A. Janmey. 1988. Identification of a polyphosphoinositide-modulated domain in gelsolin which binds to the sides of actin filaments. *J Cell Biol.* 106:805-12.
- Yin, H.L., and T.P. Stossel. 1979. Control of cytoplasmic actin gel-sol transformation by gelsolin, a calcium-dependent regulatory protein. *Nature.* 281:583-6.
- Yu, F.X., H.Q. Sun, P.A. Janmey, and H.L. Yin. 1992. Identification of a polyphosphoinositide-binding sequence in an actin monomer-binding domain of gelsolin. *J Biol Chem.* 267:14616-21.

Danksagung

Ich bedanke mich ganz herzlich bei Frau Prof. Dr. B. M. Jockusch für die Bereitstellung des interessanten Themas, sowie für die fachliche Unterstützung im Lauf der letzten Jahre. Die hervorragenden Arbeitsmöglichkeiten in ihrer Gruppe und das stetige Interesse am Voranschreiten der Arbeit haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Großer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. S. Scherneck und Dr. B. Jandrig, die mich im Rahmen eines Forschungsaufenthaltes am Max-Delbrück-Centrum (Berlin-Buch) betreut haben und mir die Möglichkeit gaben neue Methoden zu erlernen, sowie durch zahlreiche Anregungen einen großen Betrag zu meiner Arbeit leisteten. Bedanken möchte ich mich auch bei Frau R. Frege, die mich dort unermüdlich praktisch unterstützt hat. Darüber hinaus danke ich Herrn Prof. Dr. S. Scherneck für die freundliche Bereitschaft meine Arbeit als Zweitreferent zu begutachten.

Herrn Prof. Dr. J. Wehland danke ich für das Interesse und die Teilnahme an der Promotionskommission.

Bei Herrn Dr. M. Rothkegel bedanke ich mich für die fachliche Unterstützung und die stete Diskussionsbereitschaft, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Weiterhin bedanke ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe Zellbiologie für die gute Arbeitsatmosphäre und die Diskussions- und Hilfsbereitschaft. Hierbei gilt mein besonderer Dank meinen Laborkollegen Dr. Diana Fleckenstein und Sebastian Witt, mit denen ich u. a. auch außerhalb der Arbeitszeit nette Stunden verbracht habe.

Bei meinen Eltern und Tobias Abelmann bedanke ich mich für das Interesse und die geduldige (!) Unterstützung.

Für die Finanzierung meines Promotionsstudiums danke ich der Deutschen Krebshilfe/ Dr. Mildred-Scheel-Stiftung für Krebsforschung.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten:

Name: Nina Wittenmayer

Geburtsdatum: 04. Juni 1974

Geburtsort: Walsrode

Ausbildung:

1980 – 1984 Grundschule Süd Walsrode

1984 – 1986 Orientierungsstufe Walsrode

1986 – 1993 Gymnasium Walsrode

1993 – 1994 Au-Pair-Aufenthalt in Los Angeles, USA

1994 – 1999 Studium der Biologie an der Technischen Universität Braunschweig
Diplomarbeit am Zoologischen Institut, Bereich Zellbiologie in der Arbeits-
Gruppe von Frau Prof. Dr. Brigitte M. Jockusch
„Biochemische Charakterisierung der Profilin-Isoformen I und II als
Fusionsproteine mit dem „Green Fluorescent Protein“ (GFP) im Hinblick auf
ihre Eignung für zellbiologische Untersuchungen“

seit 11/1999 Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Zoologischen Institut der
Technischen Universität Braunschweig bei Frau Prof. Dr. Brigitte M.
Jockusch

- Aggeler, J., Ward, J., Blackie, L. M., Barcellos-Hoff, M. H., Streuli, C. H., and Bissell, M. J. (1991). Cytodifferentiation of mouse mammary epithelial cells cultured on a reconstituted basement membrane reveals striking similarities to development in vivo. *J Cell Sci* 99 (Pt 2), 407-417.
- Ahern-Djamali, S. M., Bachmann, C., Hua, P., Reddy, S. K., Kastenmeier, A. S., Walter, U., and Hoffmann, F. M. (1999). Identification of profilin and src homology 3 domains as binding partners for Drosophila enabled. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 4977-4982.
- Akisawa, N., Nishimori, I., Iwamura, T., Onishi, S., and Hollingsworth, M. A. (1999). High levels of ezrin expressed by human pancreatic adenocarcinoma cell lines with high metastatic potential. *Biochem Biophys Res Commun* 258, 395-400.
- Archer, S. J., Vinson, V. K., Pollard, T. D., and Torchia, D. A. (1994). Elucidation of the poly-L-proline binding site in Acanthamoeba profilin I by NMR spectroscopy. *FEBS Lett* 337, 145-151.
- Aspenstrom, P., Schutt, C. E., Lindberg, U., and Karlsson, R. (1993). Mutations in beta-actin: influence on polymer formation and on interactions with myosin and profilin. *FEBS Lett* 329, 163-170.
- Battle, E., Sancho, E., Franci, C., Dominguez, D., Monfar, M., Baulida, J., and Garcia De Herreros, A. (2000). The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* 2, 84-89.
- Ben-Ze'ev, A. (1997). Cytoskeletal and adhesion proteins as tumor suppressors. *Curr Opin Cell Biol* 9, 99-108.
- Bershadsky, A. D., Gluck, U., Denisenko, O. N., Sklyarova, T. V., Spector, I., and Ben-Ze'ev, A. (1995). The state of actin assembly regulates actin and vinculin expression by a feedback loop. *J Cell Sci* 108 (Pt 3), 1183-1193.
- Bjorkegren, C., Rozycki, M., Schutt, C. E., Lindberg, U., and Karlsson, R. (1993). Mutagenesis of human profilin locates its poly(L-proline)-binding site to a hydrophobic patch of aromatic amino acids. *FEBS Lett* 333, 123-126.
- Bjorkegren-Sjogren, C., Korenbaum, E., Nordberg, P., Lindberg, U., and Karlsson, R. (1997). Isolation and characterization of two mutants of human profilin I that do not bind poly(L-proline). *FEBS Lett* 418, 258-264.
- Blanchard, A., Ohanian, V., and Critchley, D. (1989). The structure and function of alpha-actinin. *J Muscle Res Cell Motil* 10, 280-289.
- Blum, J. L., Zeigler, M. E., and Wicha, M. S. (1987). Regulation of rat mammary gene expression by extracellular matrix components. *Exp Cell Res* 173, 322-340.
- Boshart, M., Weber, F., Jahn, G., Dorsch-Hasler, K., Fleckenstein, B., and Schaffner, W. (1985). A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell* 41, 521-530.
- Boyd, J. A., Rinehart, C. A., Jr., Walton, L. A., Siegal, G. P., and Kaufman, D. G. (1990). Ultrastructural characterization of two new human endometrial carcinoma cell lines and

normal human endometrial epithelial cells cultured on extracellular matrix. *In Vitro Cell Dev Biol* 26, 701-708.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.

Braun, A., Aszodi, A., Hellebrand, H., Berna, A., Fassler, R., and Brandau, O. (2002). Genomic organization of profilin-III and evidence for a transcript expressed exclusively in testis. *Gene* 283, 219-225.

Bretscher, A., and Weber, K. (1980). Fimbrin, a new microfilament-associated protein present in microvilli and other cell surface structures. *J Cell Biol* 86, 335-340.

Buss, F., Temm-Grove, C., Henning, S., and Jockusch, B. M. (1992). Distribution of profilin in fibroblasts correlates with the presence of highly dynamic actin filaments. *Cell Motil Cytoskeleton* 22, 51-61.

Button, E., Shapland, C., and Lawson, D. (1995). Actin, its associated proteins and metastasis. *Cell Motil Cytoskeleton* 30, 247-251.

Cao, L. G., Babcock, G. G., Rubenstein, P. A., and Wang, Y. L. (1992). Effects of profilin and profilactin on actin structure and function in living cells. *J Cell Biol* 117, 1023-1029.

Carrier, M. F., Jean, C., Rieger, K. J., Lenfant, M., and Pantaloni, D. (1993). Modulation of the interaction between G-actin and thymosin beta 4 by the ATP/ADP ratio: possible implication in the regulation of actin dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 5034-5038.

Carrier, M. F., and Pantaloni, D. (1997). Control of actin dynamics in cell motility. *J Mol Biol* 269, 459-467.

Carlsson, L., Nystrom, L. E., Sundkvist, I., Markey, F., and Lindberg, U. (1977). Actin polymerizability is influenced by profilin, a low molecular weight protein in non-muscle cells. *J Mol Biol* 115, 465-483.

Chang, F., Drubin, D., and Nurse, P. (1997). cdc12p, a protein required for cytokinesis in fission yeast, is a component of the cell division ring and interacts with profilin. *J Cell Biol* 137, 169-182.

Chen, C. L., Liu, S. S., Ip, S. M., Wong, L. C., Ng, T. Y., and Ngan, H. Y. (2003). E-cadherin expression is silenced by DNA methylation in cervical cancer cell lines and tumours. *Eur J Cancer* 39, 517-523.

Clark, T. G., and Rosenbaum, J. L. (1979). An actin filament matrix in hand-isolated nuclei of *X. laevis* oocytes. *Cell* 18, 1101-1108.

Condeelis, J. (2001). How is actin polymerization nucleated in vivo? *Trends Cell Biol* 11, 288-293.

Craig, S. W., and Powell, L. D. (1980). Regulation of actin polymerization by villin, a 95,000 dalton cytoskeletal component of intestinal brush borders. *Cell* 22, 739-746.

- Di Nardo, A., Gareus, R., Kwiatkowski, D., and Witke, W. (2000). Alternative splicing of the mouse profilin II gene generates functionally different profilin isoforms. *J Cell Sci* 113 Pt 21, 3795-3803.
- Evangelista, M., Blundell, K., Longtine, M. S., Chow, C. J., Adames, N., Pringle, J. R., Peter, M., and Boone, C. (1997). Bni1p, a yeast formin linking cdc42p and the actin cytoskeleton during polarized morphogenesis. *Science* 276, 118-122.
- Fedorov, A. A., Magnus, K. A., Graupe, M. H., Lattman, E. E., Pollard, T. D., and Almo, S. C. (1994). X-ray structures of isoforms of the actin-binding protein profilin that differ in their affinity for phosphatidylinositol phosphates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 8636-8640.
- Finkel, T., Theriot, J. A., Dose, K. R., Tomaselli, G. F., and Goldschmidt-Clermont, P. J. (1994). Dynamic actin structures stabilized by profilin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 1510-1514.
- Freedman, V. H., and Shin, S. I. (1974). Cellular tumorigenicity in nude mice: correlation with cell growth in semi-solid medium. *Cell* 3, 355-359.
- Fujiwara, I., Suetsugu, S., Uemura, S., Takenawa, T., and Ishiwata, S. (2002a). Visualization and force measurement of branching by Arp2/3 complex and N-WASP in actin filament. *Biochem Biophys Res Commun* 293, 1550-1555.
- Fujiwara, I., Takahashi, S., Tadakuma, H., Funatsu, T., and Ishiwata, S. (2002b). Microscopic analysis of polymerization dynamics with individual actin filaments. *Nat Cell Biol* 4, 666-673.
- Geese, M., Schluter, K., Rothkegel, M., Jockusch, B. M., Wehland, J., and Sechi, A. S. (2000). Accumulation of profilin II at the surface of *Listeria* is concomitant with the onset of motility and correlates with bacterial speed. *J Cell Sci* 113 (Pt 8), 1415-1426.
- Gertler, F. B., Niebuhr, K., Reinhard, M., Wehland, J., and Soriano, P. (1996). Mena, a relative of VASP and *Drosophila Enabled*, is implicated in the control of microfilament dynamics. *Cell* 87, 227-239.
- Gieselmann, R., Kwiatkowski, D. J., Janmey, P. A., and Witke, W. (1995). Distinct biochemical characteristics of the two human profilin isoforms. *Eur J Biochem* 229, 621-628.
- Giesemann, T., Rathke-Hartlieb, S., Rothkegel, M., Bartsch, J. W., Buchmeier, S., Jockusch, B. M., and Jockusch, H. (1999). A role for polyproline motifs in the spinal muscular atrophy protein SMN. Profilins bind to and colocalize with smn in nuclear gems. *J Biol Chem* 274, 37908-37914.
- Gilmore, A. P., and Burridge, K. (1996a). Regulation of vinculin binding to talin and actin by phosphatidyl- inositol-4-5-bisphosphate. *Nature* 381, 531-535.
- Gilmore, A. P., and Burridge, K. (1996b). Regulation of vinculin binding to talin and actin by phosphatidyl-inositol-4-5-bisphosphate. *Nature* 381, 531-535.
- Gioanni, J., Le Francois, D., Zanghellini, E., Mazeau, C., Ettore, F., Lambert, J. C., Schneider, M., and Dutrillaux, B. (1990). Establishment and characterisation of a new tumorigenic cell line with a normal karyotype derived from a human breast adenocarcinoma. *Br J Cancer* 62, 8-13.

- Giovanella, B. C., Stehlin, J. S., and Williams, L. J., Jr. (1974). Heterotransplantation of human malignant tumors in "nude" thymusless mice. II. Malignant tumors induced by injection of cell cultures derived from human solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 52, 921-930.
- Gluck, U., Kwiatkowski, D. J., and Ben-Ze'ev, A. (1993). Suppression of tumorigenicity in simian virus 40-transformed 3T3 cells transfected with alpha-actinin cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 383-387.
- Goldschmidt-Clermont, P. J., Furman, M. I., Wachsstock, D., Safer, D., Nachmias, V. T., and Pollard, T. D. (1992). The control of actin nucleotide exchange by thymosin beta 4 and profilin. A potential regulatory mechanism for actin polymerization in cells. *Mol Biol Cell* 3, 1015-1024.
- Goldschmidt-Clermont, P. J., Kim, J. W., Machesky, L. M., Rhee, S. G., and Pollard, T. D. (1991). Regulation of phospholipase C-gamma 1 by profilin and tyrosine phosphorylation. *Science* 251, 1231-1233.
- Gonsior, S. M., Platz, S., Buchmeier, S., Scheer, U., Jockusch, B. M., and Hinssen, H. (1999). Conformational difference between nuclear and cytoplasmic actin as detected by a monoclonal antibody. *J Cell Sci* 112, 797-809.
- Gonzalez-Garay, M. L., and Cabral, F. (1996). alpha-Tubulin limits its own synthesis: evidence for a mechanism involving translational repression. *J Cell Biol* 135, 1525-1534.
- Gorlin, J. B., Yamin, R., Egan, S., Stewart, M., Stossel, T. P., Kwiatkowski, D. J., and Hartwig, J. H. (1990). Human endothelial actin-binding protein (ABP-280, nonmuscle filamin): a molecular leaf spring. *J Cell Biol* 111, 1089-1105.
- Grenklo, S., Geese, M., Lindberg, U., Wehland, J., Karlsson, R., and Sechi, A. S. (2003). A crucial role for profilin-actin in the intracellular motility of *Listeria monocytogenes*. *EMBO Rep* 4, 1-7.
- Haarer, B. K., and Brown, S. S. (1990). Structure and function of profilin. *Cell Motil Cytoskeleton* 17, 71-74.
- Haarer, B. K., Petzold, A. S., and Brown, S. S. (1993). Mutational analysis of yeast profilin. *Mol Cell Biol* 13, 7864-7873.
- Haffner, C., Jarchau, T., Reinhard, M., Hoppe, J., Lohmann, S. M., and Walter, U. (1995). Molecular cloning, structural analysis and functional expression of the proline-rich focal adhesion and microfilament-associated protein VASP. *Embo J* 14, 19-27.
- Hajkova, L., Bjorkegren Sjogren, C., Korenbaum, E., Nordberg, P., and Karlsson, R. (1997). Characterization of a mutant profilin with reduced actin-binding capacity: effects in vitro and in vivo. *Exp Cell Res* 234, 66-77.
- Hammond, S. M., Caudy, A. A., and Hannon, G. J. (2001). Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nat Rev Genet* 2, 110-119.
- Hartwig, J. H., Chambers, K. A., Hopcia, K. L., and Kwiatkowski, D. J. (1989). Association of profilin with filament-free regions of human leukocyte and platelet membranes and reversible membrane binding during platelet activation. *J Cell Biol* 109, 1571-1579.

- Haugwitz, M., Noegel, A. A., Rieger, D., Lottspeich, F., and Schleicher, M. (1991). Dictyostelium discoideum contains two profilin isoforms that differ in structure and function. *J Cell Sci* 100, 481-489.
- Holt, M. R., and Koffer, A. (2001). Cell motility: proline-rich proteins promote protrusions. *Trends Cell Biol* 11, 38-46.
- Honjo, Y., Nangia-Makker, P., Inohara, H., and Raz, A. (2001). Down-regulation of galectin-3 suppresses tumorigenicity of human breast carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 7, 661-668.
- Honore, B., Madsen, P., Andersen, A. H., and Leffers, H. (1993). Cloning and expression of a novel human profilin variant, profilin II. *FEBS Lett* 330, 151-155.
- Hu, E., Chen, Z., Fredrickson, T., and Zhu, Y. (2001). Molecular cloning and characterization of profilin-3: a novel cytoskeleton-associated gene expressed in rat kidney and testes. *Exp Nephrol* 9, 265-274.
- Huttelmaier, S., Mayboroda, O., Harbeck, B., Jarchau, T., Jockusch, B. M., and Rudiger, M. (1998). The interaction of the cell-contact proteins VASP and vinculin is regulated by phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Curr Biol* 8, 479-488.
- Ishikawa, H., Bischoff, R., and Holtzer, H. (1969). Formation of arrowhead complexes with heavy meromyosin in a variety of cell types. *J Cell Biol* 43, 312-328.
- Janke, J., Schluter, K., Jandrig, B., Theile, M., Kolble, K., Arnold, W., Grinstein, E., Schwartz, A., Estevez-Schwarz, L., Schlag, P. M., *et al.* (2000). Suppression of tumorigenicity in breast cancer cells by the microfilament protein profilin 1. *J Exp Med* 191, 1675-1686.
- Janssen, R. A., and Mier, J. W. (1997). Tropomyosin-2 cDNA lacking the 3' untranslated region riboregulator induces growth inhibition of v-Ki-ras-transformed fibroblasts. *Mol Biol Cell* 8, 897-908.
- Jockusch, B. M., Becker, M., Hindennach, I., and Jockusch, E. (1974). Slime mould actin: homology to vertebrate actin and presence in the nucleus. *Exp Cell Res* 89, 241-246.
- Kaiser, D. A., Goldschmidt-Clermont, P. J., Levine, B. A., and Pollard, T. D. (1989). Characterization of renatured profilin purified by urea elution from poly-L-proline agarose columns. *Cell Motil Cytoskeleton* 14, 251-262.
- Kaul, S. C., Kawai, R., Nomura, H., Mitsui, Y., Reddel, R. R., and Wadhwa, R. (1999). Identification of a 55-kDa ezrin-related protein that induces cytoskeletal changes and localizes to the nucleolus. *Exp Cell Res* 250, 51-61.
- Kirsch, J., Kuhse, J., and Betz, H. (1995). Targeting of glycine receptor subunits to gephyrin-rich domains in transfected human embryonic kidney cells. *Mol Cell Neurosci* 6, 450-461.
- Kleinman, H. K., McGarvey, M. L., Liotta, L. A., Robey, P. G., Tryggvason, K., and Martin, G. R. (1982). Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma. *Biochemistry* 21, 6188-6193.

- Knezevic, I., Leisner, T. M., and Lam, S. C. (1996). Direct binding of the platelet integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$ (GPIIb-IIIa) to talin. Evidence that interaction is mediated through the cytoplasmic domains of both αIIb and $\beta 3$. *J Biol Chem* 271, 16416-16421.
- Krebs, A., Rothkegel, M., Klar, M., and Jockusch, B. M. (2001). Characterization of functional domains of mDia1, a link between the small GTPase Rho and the actin cytoskeleton. *J Cell Sci* 114, 3663-3672.
- Lambrechts, A., Braun, A., Jonckheere, V., Aszodi, A., Lanier, L. M., Robbins, J., Van Colen, I., Vandekerckhove, J., Fassler, R., and Ampe, C. (2000). Profilin II is alternatively spliced, resulting in profilin isoforms that are differentially expressed and have distinct biochemical properties. *Mol Cell Biol* 20, 8209-8219.
- Lambrechts, A., Jonckheere, V., Dewitte, D., Vandekerckhove, J., and Ampe, C. (2002). Mutational analysis of human profilin I reveals a second PI(4,5)-P2 binding site neighbouring the poly(L-proline) binding site. *BMC Biochem* 3, 12.
- Lambrechts, A., Verschelde, J. L., Jonckheere, V., Goethals, M., Vandekerckhove, J., and Ampe, C. (1997). The mammalian profilin isoforms display complementary affinities for PIP2 and proline-rich sequences. *Embo J* 16, 484-494.
- Lassing, I., and Lindberg, U. (1985). Specific interaction between phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and profilactin. *Nature* 314, 472-474.
- Laurent, V., Loisel, T. P., Harbeck, B., Wehman, A., Grobe, L., Jockusch, B. M., Wehland, J., Gertler, F. B., and Carlier, M. F. (1999). Role of proteins of the Ena/VASP family in actin-based motility of *Listeria monocytogenes*. *J Cell Biol* 144, 1245-1258.
- Leung, W. K., Yu, J., Bai, A. H., Chan, M. W., Chan, K. K., To, K. F., Chan, F. K., Ng, E. K., Chung, S. C., and Sung, J. J. (2003). Inactivation of helicase-like transcription factor by promoter hypermethylation in human gastric cancer. *Mol Carcinog* 37, 91-97.
- Levine, A. J., Momand, J., and Finlay, C. A. (1991). The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 351, 453-456.
- Lim, R., Alvarez, F. J., and Walmsley, B. (1999). Quantal size is correlated with receptor cluster area at glycinergic synapses in the rat brainstem. *J Physiol* 516 (Pt 2), 505-512.
- Lindberg, U., Schutt, C. E., Hellsten, E., Tjader, A. C., and Hult, T. (1988). The use of poly(L-proline)-Sepharose in the isolation of profilin and profilactin complexes. *Biochim Biophys Acta* 967, 391-400.
- Lu, J., and Pollard, T. D. (2001). Profilin binding to poly-L-proline and actin monomers along with ability to catalyze actin nucleotide exchange is required for viability of fission yeast. *Mol Biol Cell* 12, 1161-1175.
- Machesky, L. M., Atkinson, S. J., Ampe, C., Vandekerckhove, J., and Pollard, T. D. (1994). Purification of a cortical complex containing two unconventional actins from *Acanthamoeba* by affinity chromatography on profilin-agarose. *J Cell Biol* 127, 107-115.
- Machesky, L. M., Goldschmidt-Clermont, P. J., and Pollard, T. D. (1990). The affinities of human platelet and *Acanthamoeba* profilin isoforms for polyphosphoinositides account for their relative abilities to inhibit phospholipase C. *Cell Regul* 1, 937-950.

- Machesky, L. M., and Gould, K. L. (1999). The Arp2/3 complex: a multifunctional actin organizer. *Curr Opin Cell Biol* 11, 117-121.
- Mahadev, K., Raval, G., Bharadwaj, S., Willingham, M. C., Lange, E. M., Vonderhaar, B., Salomon, D., and Prasad, G. L. (2002). Suppression of the transformed phenotype of breast cancer by tropomyosin-1. *Exp Cell Res* 279, 40-51.
- Mahoney, N. M., Janmey, P. A., and Almo, S. C. (1997). Structure of the profilin-poly-L-proline complex involved in morphogenesis and cytoskeletal regulation [published erratum appears in *Nat Struct Biol* 1997 Dec;4(12):1047]. *Nat Struct Biol* 4, 953-960.
- Malm, B., Larsson, H., and Lindberg, U. (1983). The profilin-actin complex: further characterization of profilin and studies on the stability of the complex. *J Muscle Res Cell Motil* 4, 569-588.
- Mammoto, A., Sasaki, T., Asakura, T., Hotta, I., Imamura, H., Takahashi, K., Matsuura, Y., Shirao, T., and Takai, Y. (1998). Interactions of drebrin and gephyrin with profilin. *Biochem Biophys Res Commun* 243, 86-89.
- Manseau, L., Calley, J., and Phan, H. (1996). Profilin is required for posterior patterning of the *Drosophila* oocyte. *Development* 122, 2109-2116.
- Marzesco, A. M., Dunia, I., Pandjaitan, R., Recouvreur, M., Dauzonne, D., Benedetti, E. L., Louvard, D., and Zahraoui, A. (2002). The small GTPase Rab13 regulates assembly of functional tight junctions in epithelial cells. *Mol Biol Cell* 13, 1819-1831.
- Matsumura, F., Lin, J. J., Yamashiro-Matsumura, S., Thomas, G. P., and Topp, W. C. (1983). Differential expression of tropomyosin forms in the microfilaments isolated from normal and transformed rat cultured cells. *J Biol Chem* 258, 13954-13964.
- Mayboroda, O., Schluter, K., and Jockusch, B. M. (1997). Differential colocalization of profilin with microfilaments in PtK2 cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 37, 166-177.
- Metzler, W. J., Bell, A. J., Ernst, E., Lavoie, T. B., and Mueller, L. (1994). Identification of the poly-L-proline-binding site on human profilin. *J Biol Chem* 269, 4620-4625.
- Moldovan, N. I., Milliken, E. E., Irani, K., Chen, J., Sohn, R. H., Finkel, T., and Goldschmidt-Clermont, P. J. (1997). Regulation of endothelial cell adhesion by profilin. *Curr Biol* 7, 24-30.
- Mullins, R. D., Heuser, J. A., and Pollard, T. D. (1998). The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6181-6186.
- Mullins, R. D., and Pollard, T. D. (1999). Structure and function of the Arp2/3 complex. *Curr Opin Struct Biol* 9, 244-249.
- Neely, M. D., and Macaluso, E. (1997). Motile areas of leech neurites are rich in microfilaments and two actin-binding proteins: gelsolin and profilin. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 264, 1701-1706.
- Niebuhr, K., Ebel, F., Frank, R., Reinhard, M., Domann, E., Carl, U. D., Walter, U., Gertler, F. B., Wehland, J., and Chakraborty, T. (1997). A novel proline-rich motif present in ActA of

- Listeria monocytogenes* and cytoskeletal proteins is the ligand for the EVH1 domain, a protein module present in the Ena/VASP family. *Embo J* 16, 5433-5444.
- Nodelman, I. M., Bowman, G. D., Lindberg, U., and Schutt, C. E. (1999). X-ray structure determination of human profilin II: A comparative structural analysis of human profilins. *J Mol Biol* 294, 1271-1285.
- Nyman, T., Page, R., Schutt, C. E., Karlsson, R., and Lindberg, U. (2002). A cross-linked profilin-actin heterodimer interferes with elongation at the fast-growing end of F-actin. *J Biol Chem* 277, 15828-15833.
- Ostrander, D. B., Gorman, J. A., and Carman, G. M. (1995). Regulation of profilin localization in *Saccharomyces cerevisiae* by phosphoinositide metabolism. *J Biol Chem* 270, 27045-27050.
- Otterbein, L. R., Graceffa, P., and Dominguez, R. (2001). The crystal structure of uncomplexed actin in the ADP state. *Science* 293, 708-711.
- Owada, M. K., Hakura, A., Iida, K., Yahara, I., Sobue, K., and Kakiuchi, S. (1984). Occurrence of caldesmon (a calmodulin-binding protein) in cultured cells: comparison of normal and transformed cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 3133-3137.
- Pantaloni, D., Boujemaa, R., Didry, D., Gounon, P., and Carlier, M. F. (2000). The Arp2/3 complex branches filament barbed ends: functional antagonism with capping proteins. *Nat Cell Biol* 2, 385-391.
- Pantaloni, D., and Carlier, M. F. (1993). How profilin promotes actin filament assembly in the presence of thymosin beta 4. *Cell* 75, 1007-1014.
- Pantelouris, E. M. (1968). Absence of thymus in a mouse mutant. *Nature* 217, 370-371.
- Parish, R. W., Schmidhauser, C., Schmidt, T., and Dudler, R. K. (1987). Mechanisms of tumour cell metastasis. *J Cell Sci Suppl* 8, 181-197.
- Pawlak, G., and Helfman, D. M. (2001). Cytoskeletal changes in cell transformation and tumorigenesis. *Curr Opin Genet Dev* 11, 41-47.
- Perelroizen, I., Carlier, M. F., and Pantaloni, D. (1995). Binding of divalent cation and nucleotide to G-actin in the presence of profilin. *J Biol Chem* 270, 1501-1508.
- Perelroizen, I., Marchand, J. B., Blanchoin, L., Didry, D., and Carlier, M. F. (1994). Interaction of profilin with G-actin and poly(L-proline). *Biochemistry* 33, 8472-8478.
- Petersen, O. W., Ronnov-Jessen, L., Howlett, A. R., and Bissell, M. J. (1992). Interaction with basement membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation pattern of normal and malignant human breast epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 9064-9068.
- Pistor, S., Chakraborty, T., Walter, U., and Wehland, J. (1995). The bacterial actin nucleator protein ActA of *Listeria monocytogenes* contains multiple binding sites for host microfilament proteins. *Curr Biol* 5, 517-525.

- Pollard, T. D., Almo, S., Quirk, S., Vinson, V., and Lattman, E. E. (1994). Structure of actin binding proteins: insights about function at atomic resolution. *Annu Rev Cell Biol* 10, 207-249.
- Pollard, T. D., Blanchoin, L., and Mullins, R. D. (2000). Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 29, 545-576.
- Pollard, T. D., and Borisy, G. G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112, 453-465.
- Pollard, T. D., and Cooper, J. A. (1984). Quantitative analysis of the effect of *Acanthamoeba* profilin on actin filament nucleation and elongation. *Biochemistry* 23, 6631-6641.
- Povlsen, C. O., Fialkow, P. J., Klein, E., Klein, G., Rygaard, J., and Wiener, F. (1973). Growth and antigenic properties of a biopsy-derived Burkitt's lymphoma in thymus-less (nude) mice. *Int J Cancer* 11, 30-39.
- Pring, M., Weber, A., and Bubb, M. R. (1992). Profilin-actin complexes directly elongate actin filaments at the barbed end. *Biochemistry* 31, 1827-1836.
- Purich, D. L., and Southwick, F. S. (1997). ABM-1 and ABM-2 homology sequences: consensus docking sites for actin- based motility defined by oligoproline regions in *Listeria* ActA surface protein and human VASP. *Biochem Biophys Res Commun* 231, 686-691.
- Ramesh, N., Anton, I. M., Hartwig, J. H., and Geha, R. S. (1997). WIP, a protein associated with wiskott-aldrich syndrome protein, induces actin polymerization and redistribution in lymphoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 14671-14676.
- Reinhard, M., Giehl, K., Abel, K., Haffner, C., Jarchau, T., Hoppe, V., Jockusch, B. M., and Walter, U. (1995a). The proline-rich focal adhesion and microfilament protein VASP is a ligand for profilins. *Embo J* 14, 1583-1589.
- Reinhard, M., Jouvenal, K., Tripier, D., and Walter, U. (1995b). Identification, purification, and characterization of a zyxin-related protein that binds the focal adhesion and microfilament protein VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein). *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7956-7960.
- Reiss, J., Gross-Hardt, S., Christensen, E., Schmidt, P., Mendel, R. R., and Schwarz, G. (2001). A mutation in the gene for the neurotransmitter receptor-clustering protein gephyrin causes a novel form of molybdenum cofactor deficiency. *Am J Hum Genet* 68, 208-213.
- Ridley, A. J., and Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 70, 389-399.
- Rodriguez Fernandez, J. L., Geiger, B., Salomon, D., Sabanay, I., Zoller, M., and Ben-Ze'ev, A. (1992). Suppression of tumorigenicity in transformed cells after transfection with vinculin cDNA. *J Cell Biol* 119, 427-438.
- Rohatgi, R., Ho, H. Y., and Kirschner, M. W. (2000). Mechanism of N-WASP activation by CDC42 and phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. *J Cell Biol* 150, 1299-1310.

- Rothkegel, M., Mayboroda, O., Rohde, M., Wucherpfennig, C., Valenta, R., and Jockusch, B. M. (1996). Plant and animal profilins are functionally equivalent and stabilize microfilaments in living animal cells. *J Cell Sci* 109, 83-90.
- Rudiger, M., Jockusch, B. M., and Rothkegel, M. (1997). Epitope tag-antibody combination useful for the detection of protein expression in prokaryotic and eukaryotic cells. *Biotechniques* 23, 96-97.
- Rygaard, J. (1969). Immunobiology of the mouse mutant "Nude". Preliminary investigations. *Acta Pathol Microbiol Scand* 77, 761-762.
- Safer, D., Elzinga, M., and Nachmias, V. T. (1991). Thymosin beta 4 and Fx, an actin-sequestering peptide, are indistinguishable. *J Biol Chem* 266, 4029-4032.
- Sakisaka, T., Itoh, T., Miura, K., and Takenawa, T. (1997). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphatase regulates the rearrangement of actin filaments. *Mol Cell Biol* 17, 3841-3849.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-5467.
- Satyaswaroop, P. G., and Tabibzadeh, S. S. (1991). Extracellular matrix and the patterns of differentiation of human endometrial carcinomas in vitro and in vivo. *Cancer Res* 51, 5661-5666.
- Schafer, D. A., and Cooper, J. A. (1995). Control of actin assembly at filament ends. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11, 497-518.
- Schluter, K., Schleicher, M., and Jockusch, B. M. (1998). Effects of single amino acid substitutions in the actin-binding site on the biological activity of bovine profilin I. *J Cell Sci* 111 (Pt 22), 3261-3273.
- Schulze, H., Huckriede, A., Noegel, A. A., Schleicher, M., and Jockusch, B. M. (1989). Alpha-actinin synthesis can be modulated by antisense probes and is autoregulated in non-muscle cells. *Embo J* 8, 3587-3593.
- Schutt, C. E., Myslik, J. C., Rozycki, M. D., Goonesekere, N. C., and Lindberg, U. (1993). The structure of crystalline profilin-beta-actin. *Nature* 365, 810-816.
- Sechi, A. S., and Wehland, J. (2000). The actin cytoskeleton and plasma membrane connection: PtdIns(4,5)P(2) influences cytoskeletal protein activity at the plasma membrane. *J Cell Sci* 113 Pt 21, 3685-3695.
- Selden, L. A., Kinoshita, H. J., Estes, J. E., and Gershman, L. C. (1999). Impact of profilin on actin-bound nucleotide exchange and actin polymerization dynamics. *Biochemistry* 38, 2769-2778.
- Shapland, C., Lowings, P., and Lawson, D. (1988). Identification of new actin-associated polypeptides that are modified by viral transformation and changes in cell shape. *J Cell Biol* 107, 153-161.

- Shin, S. I., Freedman, V. H., Risser, R., and Pollack, R. (1975). Tumorigenicity of virus-transformed cells in nude mice is correlated specifically with anchorage independent growth in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 4435-4439.
- Siegfried, Z., Eden, S., Mendelsohn, M., Feng, X., Tsuberi, B. Z., and Cedar, H. (1999). DNA methylation represses transcription in vivo. *Nat Genet* 22, 203-206.
- Singh, S. S., Chauhan, A., Murakami, N., and Chauhan, V. P. (1996a). Profilin and gelsolin stimulate phosphatidylinositol 3-kinase activity. *Biochemistry* 35, 16544-16549.
- Singh, S. S., Chauhan, A., Murakami, N., Styles, J., Elzinga, M., and Chauhan, V. P. (1996b). Phosphoinositide-dependent in vitro phosphorylation of profilin by protein kinase C. Phospholipid specificity and localization of the phosphorylation site. *Recept Signal Transduct* 6, 77-86.
- Skare, P., and Karlsson, R. (2002). Evidence for two interaction regions for phosphatidylinositol(4,5)-bisphosphate on mammalian profilin I. *FEBS Lett* 522, 119-124.
- Skare, P., Kreivi, J. P., Bergstrom, A., and Karlsson, R. (2003). Profilin I colocalizes with speckles and Cajal bodies: a possible role in pre-mRNA splicing. *Exp Cell Res* 286, 12-21.
- Small, J. V., Anderson, K., and Rottner, K. (1996). Actin and the coordination of protrusion, attachment and retraction in cell crawling. *Biosci Rep* 16, 351-368.
- Sohn, R. H., Chen, J., Koblan, K. S., Bray, P. F., and Goldschmidt-Clermont, P. J. (1995). Localization of a binding site for phosphatidylinositol 4,5- bisphosphate on human profilin. *J Biol Chem* 270, 21114-21120.
- Sohn, R. H., and Goldschmidt-Clermont, P. J. (1994). Profilin: at the crossroads of signal transduction and the actin cytoskeleton. *Bioessays* 16, 465-472.
- Soule, H. D., Maloney, T. M., Wolman, S. R., Peterson, W. D., Jr., Brenz, R., McGrath, C. M., Russo, J., Pauley, R. J., Jones, R. F., and Brooks, S. C. (1990). Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. *Cancer Res* 50, 6075-6086.
- Stallmeyer, B., Nerlich, A., Schiemann, J., Brinkmann, H., and Mendel, R. R. (1995). Molybdenum co-factor biosynthesis: the *Arabidopsis thaliana* cDNA *cnx1* encodes a multifunctional two-domain protein homologous to a mammalian neuroprotein, the insect protein Cinnamon and three *Escherichia coli* proteins. *Plant J* 8, 751-762.
- Streuli, C. H., Bailey, N., and Bissell, M. J. (1991). Control of mammary epithelial differentiation: basement membrane induces tissue-specific gene expression in the absence of cell-cell interaction and morphological polarity. *J Cell Biol* 115, 1383-1395.
- Suetsugu, S., Miki, H., and Takenawa, T. (1998). The essential role of profilin in the assembly of actin for microspike formation. *Embo J* 17, 6516-6526.
- Sun, H. Q., Kwiatkowska, K., and Yin, H. L. (1995). Actin monomer binding proteins. *Curr Opin Cell Biol* 7, 102-110.
- Tall, E. G., Spector, I., Pentyala, S. N., Bitter, I., and Rebecchi, M. J. (2000). Dynamics of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in actin-rich structures. *Curr Biol* 10, 743-746.

- Tanaka, M., and Shibata, H. (1985). Poly(L-proline)-binding proteins from chick embryos are a profilin and a profilactin. *Eur J Biochem* 151, 291-297.
- Tang, D. D., and Tan, J. (2003). Downregulation of profilin with antisense oligodeoxynucleotides inhibits force development during stimulation of smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*.
- Theile, M., Hartmann, S., Scherthan, H., Arnold, W., Deppert, W., Frege, R., Glaab, F., Haensch, W., and Scherneck, S. (1995). Suppression of tumorigenicity of breast cancer cells by transfer of human chromosome 17 does not require transferred BRCA1 and p53 genes. *Oncogene* 10, 439-447.
- Theriot, J. A., and Mitchison, T. J. (1993). The three faces of profilin. *Cell* 75, 835-838.
- Theriot, J. A., Rosenblatt, J., Portnoy, D. A., Goldschmidt-Clermont, P. J., and Mitchison, T. J. (1994). Involvement of profilin in the actin-based motility of *L. monocytogenes* in cells and in cell-free extracts. *Cell* 76, 505-517.
- Tilney, L. G., Bonder, E. M., Coluccio, L. M., and Mooseker, M. S. (1983). Actin from *Thyone* sperm assembles on only one end of an actin filament: a behavior regulated by profilin. *J Cell Biol* 97, 112-124.
- Tobacman, L. S., and Korn, E. D. (1982). The regulation of actin polymerization and the inhibition of monomeric actin ATPase activity by *Acanthamoeba* profilin. *J Biol Chem* 257, 4166-4170.
- Van Troys, M., Dewitte, D., Verschelde, J. L., Goethals, M., Vandekerckhove, J., and Ampe, C. (2000). The competitive interaction of actin and PIP2 with actophorin is based on overlapping target sites: design of a gain-of-function mutant. *Biochemistry* 39, 12181-12189.
- Vandekerckhove, J., Bauw, G., Vancompernelle, K., Honore, B., and Celis, J. (1990). Comparative two-dimensional gel analysis and microsequencing identifies gelsolin as one of the most prominent downregulated markers of transformed human fibroblast and epithelial cells. *J Cell Biol* 111, 95-102.
- Vandekerckhove, J. S., Kaiser, D. A., and Pollard, T. D. (1989). *Acanthamoeba* actin and profilin can be cross-linked between glutamic acid 364 of actin and lysine 115 of profilin. *J Cell Biol* 109, 619-626.
- Vemuri, B., and Singh, S. S. (2001). Protein kinase C isozyme-specific phosphorylation of profilin. *Cell Signal* 13, 433-439.
- Verheyen, E. M., and Cooley, L. (1994). Profilin mutations disrupt multiple actin-dependent processes during *Drosophila* development. *Development* 120, 717-728.
- Wang, X., Kibschull, M., Laue, M. M., Lichte, B., Petrasch-Parwez, E., Kilimann, M. W., Diez-Gomez, M. L., Quirce, S., Cuevas, M., Sanchez-Fernandez, C., *et al.* (1999). Aczonin, a 550-kD putative scaffolding protein of presynaptic active zones, shares homology regions with rim and bassoon and binds profilin [In Process Citation]
- Fruit-pollen-latex cross-reactivity: implication of profilin (Bet v 2) [In Process Citation]
- Profilin in *Phaseolus vulgaris* is encoded by two genes (only one expressed in root nodules) but multiple isoforms are generated in vivo by phosphorylation on tyrosine residues

- Activation of the CDC42 effector N-WASP by the shigella flexneri IcsA protein promotes actin nucleation by Arp2/3 complex and bacterial actin- based motility [In Process Citation]
- Mutational analysis of Ser14 and Asp157 in the nucleotide-binding site of beta-actin
- Pollen allergy in peach-allergic patients: Sensitization and cross- reactivity to taxonomically unrelated pollens
- Selective Cloning of Peanut Allergens, Including Profilin and 2S Albumins, by Phage Display Technology
- Distinct roles of profilin in cell morphological changes: microspikes, membrane ruffles, stress fibers, and cytokinesis [In Process Citation]
- Lipid kinases are novel effectors of the GTPase Rac1 [In Process Citation]
- Movement of a cytokinesis factor cdc12p to the site of cell division
- Pollinosis to *Ricinus communis* (castor bean): an aerobiological, clinical and immunochemical study
- Serological characterization of allergens in poppy seeds [In Process Citation]
- Cellular functions of TC10, a Rho family GTPase: regulation of morphology, signal transduction and cell growth
- Altered gene expression pattern in the fatty liver dystrophy mouse reveals impaired insulin-mediated cytoskeleton dynamics
- Identification of a 36-kDa olive-pollen allergen by in vitro and in vivo studies
- Fluorescent phosphoinositide derivatives reveal specific binding of gelsolin and other actin regulatory proteins to mixed lipid bilayers
- A heterozygous mutation of beta-actin associated with neutrophil dysfunction and recurrent infection
- Profilin binds proline-rich ligands in two distinct amide backbone orientations
- Megakaryocyte hyperplasia and enhanced agonist-induced platelet activation in vasodilator-stimulated phosphoprotein knockout mice
- Association of birch pollen-related food-responsive atopic dermatitis with birch pollen allergen-specific T-cell reactions. *J Cell Biol* 147, 151-162.
- Watanabe, N., Madaule, P., Reid, T., Ishizaki, T., Watanabe, G., Kakizuka, A., Saito, Y., Nakao, K., Jockusch, B. M., and Narumiya, S. (1997). p140mDia, a mammalian homolog of *Drosophila* diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin. *Embo J* 16, 3044-3056.
- Welch, M. D. (1999). The world according to Arp: regulation of actin nucleation by the Arp2/3 complex. *Trends Cell Biol* 9, 423-427.
- Welch, M. D., Rosenblatt, J., Skoble, J., Portnoy, D. A., and Mitchison, T. J. (1998). Interaction of human Arp2/3 complex and the *Listeria monocytogenes* ActA protein in actin filament nucleation. *Science* 281, 105-108.
- White, T. E., di Sant'Agnese, P. A., and Miller, R. K. (1990). Human endometrial cells grown on an extracellular matrix form simple columnar epithelia and glands. *In Vitro Cell Dev Biol* 26, 636-642.
- Wicha, M. S., Lowrie, G., Kohn, E., Bagavandoss, P., and Mahn, T. (1982). Extracellular matrix promotes mammary epithelial growth and differentiation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 3213-3217.
- Witke, W., Sutherland, J. D., Sharpe, A., Arai, M., and Kwiatkowski, D. J. (2001). Profilin I is essential for cell survival and cell division in early mouse development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 3832-3836.

- Wittenmayer, N., Rothkegel, M., Jockusch, B. M., and Schluter, K. (2000). Functional characterization of green fluorescent protein-profilin fusion proteins. *Eur J Biochem* 267, 5247-5256.
- Yamamoto, K., Pardee, J. D., Reidler, J., Stryer, L., and Spudich, J. A. (1982). Mechanism of interaction of Dictyostelium severin with actin filaments. *J Cell Biol* 95, 711-719.
- Yamamoto, T., Gotoh, M., Kitajima, M., and Hirohashi, S. (1993). Thymosin beta-4 expression is correlated with metastatic capacity of colorectal carcinomas. *Biochem Biophys Res Commun* 193, 706-710.
- Yin, H. L., Iida, K., and Janmey, P. A. (1988). Identification of a polyphosphoinositide-modulated domain in gelsolin which binds to the sides of actin filaments. *J Cell Biol* 106, 805-812.
- Yin, H. L., and Stossel, T. P. (1979). Control of cytoplasmic actin gel-sol transformation by gelsolin, a calcium-dependent regulatory protein. *Nature* 281, 583-586.
- Yu, F. X., Sun, H. Q., Janmey, P. A., and Yin, H. L. (1992). Identification of a polyphosphoinositide-binding sequence in an actin monomer-binding domain of gelsolin. *J Biol Chem* 267, 14616-14621.